

**NOV (CCN3)-vermittelte Signalkaskaden zur Regulation der
Migration und Proliferation der humanen
Trophoblastzelllinie Jeg3**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für
Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Jessica Wagener
aus Essen

August 2011

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Molekularbiologie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Elke Winterhager

2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Astrid Westendorf

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2011

ABKÜRZUNGEN	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Die humane Plazenta.....	1
1.1.1 Trophoblastinvasion	3
1.1.2 Regulation der Trophoblastinvasion.....	5
1.1.2.1 Der MAPK/ERK-Signalweg	7
1.1.2.2 Der PI3K/Akt-Signalweg.....	7
1.1.2.3 Integrine	8
1.1.3 Die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 als Modell für den humanen extravillösen Trophoblasten	10
1.2 Die CCN-Proteinfamilie	11
1.2.1 NOV (CCN3)	12
1.3 Präeklampsie	14
1.3.1 Fehlentwicklung der präeklampsischen Plazenta.....	15
1.4 Zielsetzung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Substanzen und Kits	19
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
2.1.3 Laborgeräte	21
2.1.4 Enzyme	22
2.1.5 Antikörper	22
2.1.6 Oligonukleotide.....	23
2.1.7 Zelllinie	23
2.1.8 Patientenproben.....	23
2.1.9 Software und Datenbanken.....	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Kultivierung von parentalen Jeg3 Zellen.....	24
2.2.2 Kultivierung von stabil transfizierten Jeg3 Zellen.....	24
2.2.3 Passagieren von Chorionkarzinomzellen.....	25
2.2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.2.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Chorionkarzinomzellen.....	25
2.2.6 Behandlung mit rekombinantem NOV und verschiedenen Inhibitoren	26
2.2.7 Transfektion mit siRNA	27

2.2.8 Bestimmung der Proliferationsrate.....	27
2.2.9 Migrations- und Invasionsassay.....	27
2.2.10 Immunzytochemie	28
2.2.11 Proteinextraktion aus Chorionkarzinomzellen.....	29
2.2.12 Proteinextraktion aus Plazentagewebe.....	29
2.2.13 Aufarbeitung von Zellüberständen	29
2.2.14 Aufarbeitung von humanen Serum- und Urinproben	30
2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration	30
2.2.16 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	31
2.2.17 Western Blot.....	31
2.2.18 Gelatin-Zymographie.....	32
2.2.19 Endoglykosidase-Behandlung.....	33
2.2.20 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	33
2.2.21 Isolierung von RNA	34
2.2.22 Reverse Transkription	34
2.2.23 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	35
2.2.24 DNA-Gelelektrophorese	35
2.2.25 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	36
2.2.26 Quantitative real-time PCR	36
2.2.27 Statistische Auswertung	37
3. ERGEBNISSE.....	38
3.1 Expression des matrizellulären CCN-Proteins NOV (CCN3) in der humanen Trophoblastzelllinie Jeg3, im Plazentagewebe, Blutserum und Urin von Präeklampsiepatientinnen	38
3.1.1 Überexpression von NOV in der humanen Trophoblastzelllinie Jeg3	38
3.1.2 Analyse des Glykosylierungsstatus von NOV in Jeg3 Zellen	39
3.1.3 Glykosylierung von NOV in Plazentagewebe, Blutserum und Urin	41
3.1.4 NOV als potentieller molekularer Marker für die Früherkennung von Präeklampsie oder HELLP-Syndrom	42
3.2 Einfluss von NOV auf Proliferation, Migration und Invasion von Jeg3 Trophoblastzellen ...	44
3.2.1 Einfluss von NOV auf das Proliferationsverhalten	44
3.2.2 Einfluss von NOV auf das Migrations- und Invasionsverhalten	46
3.2.3 NOV-abhängige Regulierung der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9, sowie ADAM-12.....	47
3.3 Untersuchung von NOV-abhängigen Signalkaskaden in Jeg3 Zellen	50
3.3.1 Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges	51
3.3.2 Aktivierung des MAP-Kinase/ERK-Signalweges	53

3.3.3 Die Inhibition der durch NOV aktivierten Signalkaskaden verändert das Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen	54
3.3.4 Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1 α (Hif-1 α) durch glykosyliertes NOV.....	56
3.4 Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt NOV-induzierte Zellprozesse.....	58
3.4.1 Integrin-Expression in Jeg3 Zellen.....	58
3.4.2 Die NOV-induzierte Migration von Jeg3 Zellen wird durch Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt	60
3.4.3 Die antiproliferative Wirkung von NOV wird nicht über Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt	63
3.4.4 Veränderung der durch NOV aktivierten Signalkaskaden nach Knockdown von Integrin $\alpha 5\beta 1$..	65
4. DISKUSSION	68
4.1 Expression verschiedener Glykosylierungsformen des matrizellulären NOV-Proteins in Jeg3 Trophoblastzellen.....	69
4.2 Die N-Glykosylierung von NOV hat keine Relevanz für die Präeklampsie-Früherkennung ..	70
4.3 Der Glykosylierungsstatus von NOV hat keinen Einfluss auf die antiproliferative Wirkung in Jeg3 Zellen	71
4.4 Die migrationsfördernde Wirkung von NOV in Jeg3 Zellen wird ausschließlich von unglykosyliertem NOV vermittelt	73
4.5 Die molekularen Mechanismen der NOV-regulierten Prozesse in Jeg3 Trophoblastzellen ..	75
4.5.1 Aktivierung von Akt und ERK1/2 in NOV-stimulierten Jeg3 Zellen.....	76
4.5.2 Die sauerstoffunabhängige Aktivierung von Hif-1 α durch NOV.....	77
4.5.3 Die Involvierung der MAPK/ERK- und der PI3K/Akt-Signalkaskade an den NOV-vermittelten Zellprozessen	78
4.5.4 Die Rolle von Integrin $\alpha 5\beta 1$ als NOV Rezeptor in Jeg3 Zellen.....	79
4.6 Ausblick.....	82
5. ZUSAMMENFASSUNG	84
6. LITERATURVERZEICHNIS	86
LEBENS LAUF	95
ERKLÄRUNG.	96
DANKSAGUNG	97

ABKÜRZUNGEN

ADAM-12S	<i>a disintegrin and metalloproteinase-12 soluble</i>
Asn	Asparagin
APS	Ammoniumpersulfat
BFA	Brefeldin A
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CT	<i>cysteine knot containing family of growth regulator</i>
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CYR61	<i>cysteine-rich61</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithithreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Endo Hf	Endoglykosidase Hf
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EVT	extravillöser Trophoblast
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
GSK	Glykogen Synthase Kinase
hCG	<i>human chorionic gonadotropin</i>
HELLP	<i>hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count</i>
Hif	Hpoxie-induzierbarer Faktor
hPL	<i>human placental lactogen</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IUGR	<i>intrauterine growth restriction</i>
JNK	<i>c-Jun terminal kinase</i>
KCl	Kaliumchlorid

KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MAP2K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAP3K	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAV	<i>myeloblastosis associated virus</i>
MEK	<i>MAP kinase or ERK kinase</i>
M-MLV-RT	<i>moloney murine leukemia virus reverse transcriptase</i>
MMP	Matrixmetalloprotease
MO	Monensin
mTor	<i>mammalian target of rapamycin</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NOV	<i>nephroblastoma overexpressed</i>
NT	aminoterminal
p	phosphoryliert
PAI	<i>plasminogen activator inhibitor</i>
PAPP-A1	<i>pregnancy associated plasma protein A1</i>
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PIP	<i>phosphatidylinositol-phosphat</i>
PKB	<i>proteinkinase B</i>
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PNGase F	Peptide Endoglykosidase F
PP13	<i>placental protein 13</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
RT	reverse Transkription
rNOV	rekombinantes NOV
ROCK	Rho-associated kinase
RTK	receptor tyrosine kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
sFlt	<i>solluble fms-like tyrosine kinase</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

Src	<i>sarcoma kinase</i>
SSW	Schwangerschaftswoche
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TSP-1	<i>thrombospondin type 1 repeat</i>
Tyr	Tyrosin
uPA	<i>urokinase plasminogen activator</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
v/v	Volumenprozent
VWC	<i>von Willebrandfactor type C</i>
Wisp	<i>Wnt-induced secreted protein</i>
Wnt	<i>wingless/integration-1</i>
w/v	Gewichtsprozent

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Schematischer Aufbau der humanen Plazenta	2
Abb.1.2	Schematische Darstellung der Trophoblastinvasion	4
Abb.1.3	Schematische Darstellung der Signalwege, die an der Invasion und Migration des Trophoblasten beteiligt sind	6
Abb. 1.4	Schema des modularen Aufbaus von CCN-Proteinen am Beispiel von NOV (CCN3)	12
Abb. 1.5	Anormale Trophoblastinvasion in der Präeklampsie	16
Abb.3.1	Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen	39
Abb. 3.2	N-Glykosylierungsstatus der verschiedenen Formen des NOV-Proteins	40
Abb. 3.3	N-Glykosylierungsstatus von NOV in Plazenta, Serum und Urin	42
Abb. 3.4	Quantifizierung der NOV-Serumlevel	43
Abb. 3.5	Einfluss von NOV auf das Wachstumsverhalten von Jeg3 Zellen	45
Abb. 3.6	Einfluss von NOV auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Jeg3 Zellen	47
Abb. 3.7	Expression und Aktivierung der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 in Abhängigkeit von rNOV	49
Abb. 3.8	Sezernierung von ADAM-12S in Abhängigkeit von NOV	50
Abb. 3.9	Aktivierung von FAK in Jeg3 Zellen	51
Abb. 3.10	NOV-abhängige Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade in Jeg3 Zellen	52
Abb. 3.11	NOV-abhängige Aktivierung der MAPK/ERK-Signalkaskade	54
Abb. 3.12	Die NOV-abhängigen Signaltransduktionskaskaden werden unabhängig voneinander aktiviert	55
Abb. 3.13	Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen nach Blockade der durch NOV aktivierten Signalkaskaden	56
Abb. 3.14	Stabilisierung des Hif-1 α Proteins durch glykosyliertes rNOV in Jeg3 Zellen	57
Abb. 3.15	Expression von Integrinen in Jeg3 Zellen	59
Abb. 3.16	Lokalisationsänderung von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ in rNOV-behandelten Jeg3 Zellen	60
Abb. 3.17	Änderung der NOV-abhängigen Migration von Jeg3 Zellen nach Integrin-Blockierung	61
Abb. 3.18	Knockdown von Integrin $\alpha 5$ mittels siRNA und der Einfluss auf die Migration von Jeg3 Zellen	62
Abb. 3.19	Auswirkungen des Integrin $\alpha 5$ Knockdowns auf das Proliferationsverhalten	64
Abb. 3.20	Veränderung der NOV-abhängigen Signalkaskaden nach Knockdown von Integrin $\alpha 5$	66
Abb. 4.1	Die molekularen Wirkmechanismen von NOV in Jeg3 Trophoblastzellen	88

1. EINLEITUNG

1.1 Die humane Plazenta

Die Plazenta ist das erste Organ, welches während der Entwicklung von Säugetieren gebildet wird und stellt die Verbindung zwischen embryonalem und maternalem Gewebe dar. Sie reguliert die intrauterine Entwicklung des Embryos, indem sie verschiedene Organfunktionen übernimmt. Dazu gehören die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie die Entsorgung von toxischen Stoffwechselprodukten im Austausch mit dem maternalen Blut. Die Grundvoraussetzung für diese Prozesse ist die Modulation des maternalen arteriellen Gefäßsystems. Die Entwicklung der humanen Plazenta ist durch eine Invasion des fetalen Trophektoderm in das maternale Endometrium gekennzeichnet, wodurch ein direkter Kontakt zwischen Trophoblast und maternalem Blut hergestellt wird. Dabei kommt es zur Arrosion arterieller maternaler Gefäße und zur Ausbildung einer hämochorialen Plazenta (Benirschke und Kaufmann, 2000).

Zum Zeitpunkt der Implantation hat sich die Blastozyste bereits in die beiden entscheidenden „Lineages“, Embryoblast und Trophoblast, differenziert. Aus dem Embryoblast entwickeln sich der Fötus, die Nabelschnur und das Amnion, während sich aus dem Trophoblast, der äußeren Schicht der Blastozyste, der embryonale Teil der Plazenta entwickelt.

Unmittelbar nach der Implantation in das Endometrium differenziert der Trophoblast in zwei Kompartimente (Benirschke und Kaufmann, 2000): die äußere Schicht, die Kontakt zum mütterlichen Gewebe bekommt, und deren nicht mehr proliferierende Zellen zu einem mehrkernigen Synzytium verschmelzen, wird als Synzytiotrophoblast bezeichnet. Die darunterliegenden nicht fusionierten Zellen werden als Zytotrophoblast bezeichnet. Sie stellen die proliferierenden Stammzellen für den Trophoblast dar, die ständig durch Fusion in den Synzytiotrophoblast aufgenommen werden, wodurch dieser an Masse zunimmt. Der Synzytiotrophoblast beginnt invasiv in das maternale Stroma, das zur Dezidua transformiert ist, einzuwandern. In der reifen Plazenta bildet der Synzytiotrophoblast die epitheliale Oberfläche der villösen Zotten und ist von maternalem Blut umgeben. Er sezerniert u.a. Hormone wie hCG (*human chorionic gonadotropin*) und hPL (*human placental lactogen*) (Lunghi et al., 2007).

Die Entwicklung der Plazenta und des Embryos findet während des ersten Schwangerschaftstrimesters (1.-13. Schwangerschaftswoche; SSW) in einem hypoxischen Milieu (1-3 % O₂) statt (Rodesch et al., 1992; Jauniaux et al., 2000), da die maternalen Spiralarterien durch sogenannte „Plugs“ bestehend aus extravillösen Trophoblastzellen blockiert sind, und so der Blutfluss verhindert wird (Hustin und Schaaps, 1987) (siehe auch Abschnitt 1.1.1). Da der Embryo nur einen geringen Schutz gegen Sauerstoff-generierte Radikale hat (Cannigia et al., 1999), ist diese Hypoxie für die normale Entwicklung des Embryos und der Plazenta essentiell (Jauniaux et al., 2006; Cartwright et al., 2007). Am Ende des ersten Trimesters (10.-12. SSW) verschwinden die Trophoblastzellen, die die Spiralarterien blockieren und das maternale Blut ergießt sich in den intervillösen Raum, was zu einem Anstieg des Sauerstoffgehalts auf 8% führt (Rodesch et al., 1992).

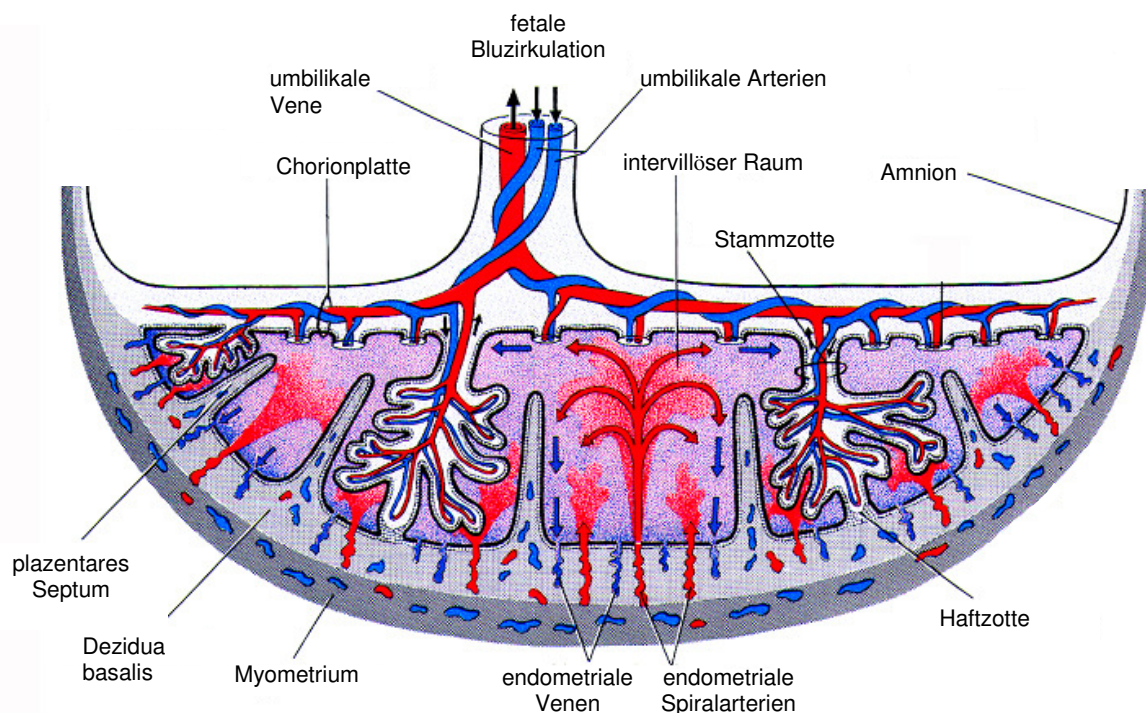


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der humanen Plazenta (modifiziert nach Grey, 2004)

In der 13. Schwangerschaftswoche nimmt die Plazenta ihre definitive Struktur ein (Abb. 1.1). Die fetale Chorionplatte bildet die Begrenzung der Plazenta zur Amnionhöhle. Hauptbestandteile der Chorionplatte sind die in Bindegewebe eingebetteten umbilikalen Gefäße, die in die von der Chorionplatte ausgehenden Zottenbäume abzweigen (Leiser und Kaufmann, 1994). Die komplex verzweigten

Zottenbäume, die etwa 50% des endgültigen Plazentagewichtes ausmachen, ragen von der Chorionplatte in den intervillösen Raum und werden vom mütterlichen Blut umspült, hier findet der fetomaternaler Stoffaustausch statt. Manche der Chorion-Zotten verankern sich mit der gegenüberliegenden Begrenzung der Plazenta, der Dezidua basalis, und werden als Haftzotten bezeichnet.

1.1.1 Trophoblastinvasion

Das Einwandern von extravillösen Trophoblastzellen in die Dezidua ist ein essentieller Vorgang in der Entwicklung der frühen Plazenta. Dabei spielen sowohl Invasions- als auch Migrationsvorgänge eine Rolle. Die invadierenden Trophoblastzapfen werden als Primärzotten bezeichnet. Wie bereits erwähnt sind sie von einer epithelialen Trophoblast-Doppelschicht umgeben, die sich aus dem außen liegenden Synzytio- und dem darunterliegenden Zytotrophoblast zusammensetzt. Aus den Zytotrophoblastzellen entwickeln sich villöse und extravillöse Zellpopulationen (Ohlsson, 1989; Benirschke und Kaufmann, 2000). Während die villösen Trophoblastzellen als Stammzellen für den Synzytiotrophoblast fungieren, invadieren die extravillösen Trophoblastzellen (EVT-Zellen) in die Dezidua (Kaufmann und Burton, 1994). Die EVT-Zellen sind differenzierte Zytotrophoblastzellen, welche durch die synzytiale Zellschicht brechen und als Zellsäulen in das uterine Stroma invadieren (Lunghi et al., 2007). Proximal der Zellsäule findet eine starke Proliferation der EVT-Zellen statt, die den „Pool“ für die sich ablösenden invadierenden EVT darstellen. Ausgehend von der Spitze der Zellsäule migrieren diese sich ablösenden EVT-Zellen und dringen aktiv in das maternale Gewebe ein (Abb. 1.2). Dabei durchlaufen sie ein Differenzierungsprogramm, welches mit dem Verlassen des Zellzyklus einhergeht und charakterisiert ist durch eine Herunterregulation des EGF(*epidermal growth factor*)-Rezeptors und eine Hochregulation des Tyrosinkinase-Rezeptors c-erbB-2 (auch Her2/neu) (Mühlhauser et al., 1993).

Die sogenannten interstitiellen EVT-Zellen migrieren durch die Dezidua und fusionieren im tiefer liegenden Myometrium zu den multinukleären Trophoblast-Riesenzellen (Pijneborg et al., 1980). Diese verlieren ihre Migrations- und Invasionsfähigkeit und begrenzen so die Invasionstiefe in das maternale Kompartiment. Die als endovaskulärer Trophoblast bezeichneten EVT-Zellen

infiltrieren die uterinen Spiralarterien, was zunächst zu einer Blockade dieser Gefäße führt. Dieser Zustand hält bis zum Ende des ersten Trimesters an. Die Versorgung des frühen Embryos wird während dieser Zeitspanne durch die Sekretionsprodukte der uterinen Drüsen gewährleistet (Burton et al., 2002; Hempstock et al., 2004), die von sogenannten endoglandulären EVT-Zellen infiltriert werden (Moser et al., 2010). Erst mit Beginn des zweiten Trimesters kommt es zur Auflösung des Blutstaus in den Spiralarterien und zur Etablierung des Blutflusses in den intervillösen Raum (Hustin und Schaaps, 1987; Jaffe et al., 1997; jauniaux et al., 2000; Kliman, 2000). Die endovaskulären EVT-Zellen ersetzen die Endothelzellen der Spiralarterien (Brosens et al., 2002; Loregger et al., 2003). Dabei kommt es zu einer morphologischen Umgestaltung der Gefäßwand der Spiralarterien, wodurch diese erweitert werden und nicht mehr kontrahieren können. Auf diese Weise wird der für die Versorgung des Embryos notwendige erhöhte permanente Blutfluß gewährleistet.

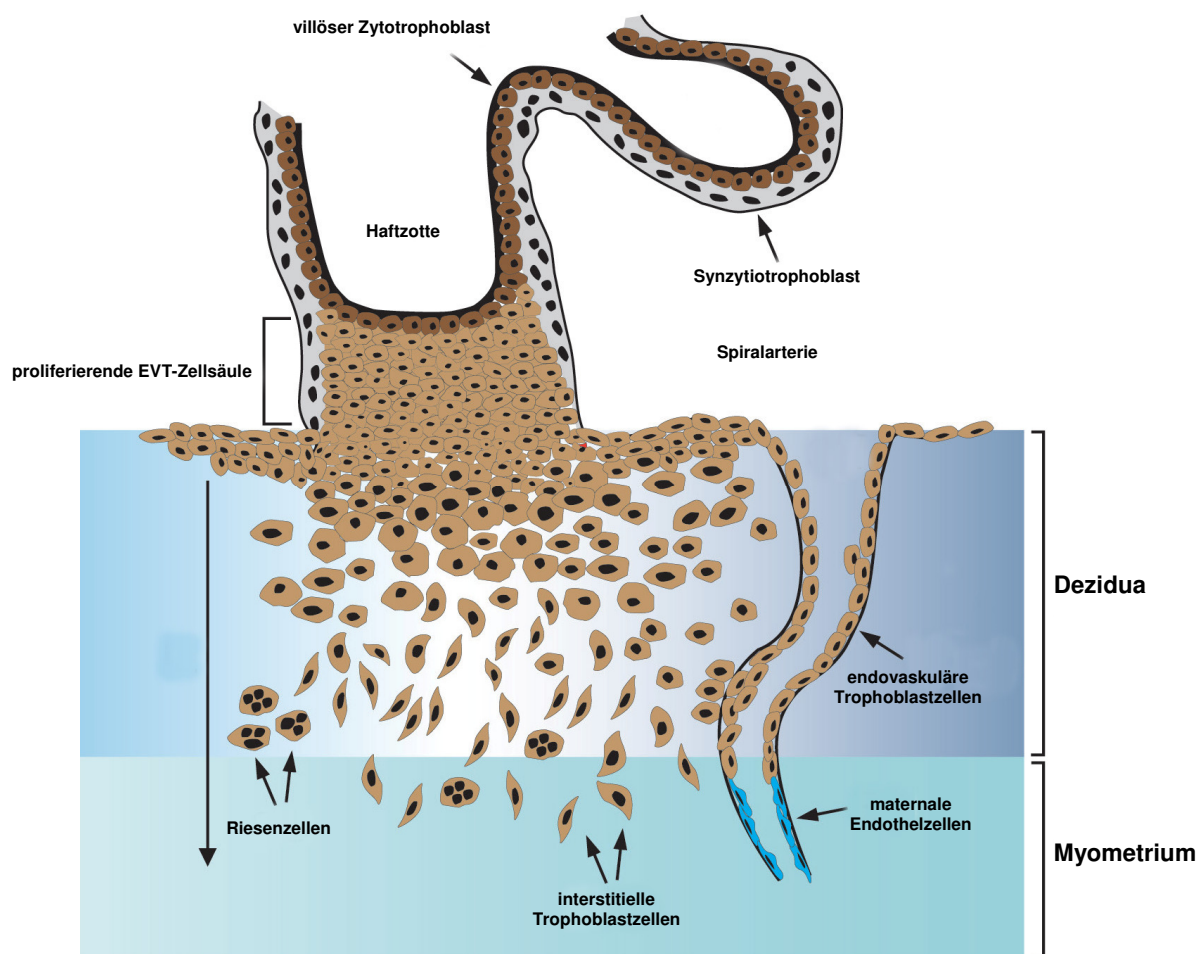


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Trophoblastinvasion

Querschnitt einer Haftzotte mit Kontakt zum maternalen Kompartiment (modifiziert nach Knöfler, 2010)

1.1.2 Regulation der Trophoblastinvasion

Wie bereits in den vorherigen Abschnitten erwähnt unterliegt die Migration und Invasion des Trophoblasten in das maternale Kompartiment einer strengen Regulation durch maternale und embryonale Faktoren. Da die interstitiellen und endovaskulären EVT-Zellen durch die Dezidua nicht weiter als bis zum ersten Drittel des darunterliegenden Myometriums gelangen, muss die Invasivität und Migrationsfähigkeit dieser Zellen sowohl zeitlich als auch räumlich durch stimulierende sowie inhibierende Faktoren reguliert werden (Lala und Hamilton, 1996; Bischof et al., 2000). Um aktiv in das maternale Gewebe eindringen zu können, sekretieren interstitielle EVT-Zellen verschiedene Komponenten, die die extrazelluläre Matrix (EZM) degradieren, dazu gehören Matrixmetalloproteasen (insbesondere MMP-2 und -9), Cathepsine und uPA (*urokinase plasminogen activator*) (Bischof et al., 2000; Lala und Chakraborty, 2003; Varanou et al., 2006). Die Zellen der Dezidua dagegen exprimieren die Antagonisten dieser invasiven Faktoren wie TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) und PAI (*plasminogen activator inhibitor*) (Lala und Graham, 1990; Schatz und Lockwood, 1993). Die Proliferation und die Migrationsfähigkeit der EVT-Zellen werden über die autokrine und parakrine Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden durch zahlreiche Faktoren kontrolliert. Dabei kann die Aktivierung über externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Chemokine und Cytokine erfolgen (Bischof et al., 2000; Zhou et al., 2002; Ferretti et al., 2007; Prast et al., 2008), oder Zell-Matrix Kontakte initiieren die Signalkaskaden über die Interaktion mit RTKs (*receptor tyrosin kinases*), Integrinen oder GPCRs (*G-protein-coupled receptors*) (Aplin et al., 2000; Schuppan und Ocker 2003; Klaffky et al., 2006). Eine Übersicht über die in der Literatur bekannten Signalkaskaden, die bei der Trophoblastinvasion bzw. -migration eine Rolle spielen, sowie über die zahlreichen Faktoren, die diese initiieren, gibt Abbildung 1.3.



Stimulierung der Trophoblastmigration/-invasion

Abb. 1.3 Schematische Darstellung der Signalwege, die an der Stimulierung der Invasion und Migration des Trophoblasten beteiligt sind. (modifiziert nach Knöfler, 2010)

In einigen Fällen erfolgt die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden durch den gleichen externen Stimulus (siehe Abb. 1.3). So zeigten z.B. Untersuchungen an benignen Trophoblastzelllinien, dass durch die Stimulierung mit EGF und HGF (*hepatocyte growth factor*) sowohl der MAPK/ERK-Signalweg (Abb.1.3, in rot dargestellt; siehe auch Abschnitt 1.1.2.1) als auch der PI3K/Akt-Signalweg (Abb. 1.3 in violett dargestellt; siehe auch Abschnitt 1.1.2.2) aktiviert wurden, was in beiden Fällen zu erhöhten Migrations- und Invasionsraten der Zellen, sowie im Falle von EGF zu einer erhöhten Expression und Sekretion von MMP-9 führte (Cartwright et al., 2002a; Cartwright et al., 2002b; Qiu et al., 2004a; Qiu et al., 2004b). Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Stimulierung mit hCG gleichzeitig den MAPK/ERK- und den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, was zu einer erhöhten Migrations- und Invasionsrate von primären Trophoblastzellen und der Trophoblastzelllinie SGHPL-5 führte (Prast et al., 2008). Im Falle von IGF-II (insulin-like growth factor II) konnte neben dem MAPK/ERK- und dem PI3K/Akt-Signalweg

die Aktivierung eines dritten für die Trophoblastinvasion/-migration kritischen Signalweges gezeigt werden, der die Familie von Rho-GTPasen und ROCK (*Rho-associated kinase*) beinhaltet (Abb. 1.3 in orange dargestellt) (McKinnon et al., 2001; Qiu et al., 2005; Shields et al., 2007).

1.1.2.1 Der MAPK/ERK-Signalweg

Die Familie der MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*) umfasst eine große Gruppe von Enzymen, die aufeinanderfolgend durch Phosphorylierung spezifischer Serin-, Threonin- und Tyrosin-Reste aktiviert werden (Seger und Krebs, 1995). In einem mehrstufigen Signaltransduktionsweg der durch zahlreiche Stimuli aktiviert wird, regulieren sie diverse physiologische Prozesse der Zelle wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose (Pearson et al., 2001). Die eigentlichen MAPKs werden durch die vorangeschalteten Mitglieder MAPKK-Kinase (MAP3K; z.B. Raf) und MAPK-Kinase (MAP2K; z.B. Mek) aktiviert und unterteilen sich in drei weitere Signalwege (Seger und Krebs, 1995): p38 MAPK und JNK (*c-Jun terminal kinase*), welche vorwiegend mit Stress- und Inflammations-Reaktionen assoziiert sind (Kyriakis und Avruch, 2001), sowie ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*). Der Raf-Mek-ERK1/2 Weg spielt bei der Entwicklung der Plazenta eine Rolle in der Regulation der EVT Migration. Zwar wurde die Beteiligung des Raf-Proteins bisher nur in der murinen Plazenta untersucht (Galabova-Kovacs et al., 2006), jedoch zeigten Studien an verschiedenen Trophoblastzelllinien die Aktivierung von ERK1/2 über Mek mit Hilfe spezifischer Mek-Inhibitoren und eine mit diesem Signalweg verbundene Stimulierung der Trophoblastmigration (Gleeson et al., 2001; McKinnon et al., 2001; Cartwright et al., 2002b). Dass ERK auch ein kritischer Faktor bei der Invasion von Trophoblastzellen ist, belegen Studien, die eine ERK-abhängige Induktion von MMP-2 und MMP-9 zeigten (Qiu et al., 2004b; Prast et al., 2008).

1.1.2.2 Der PI3K/Akt-Signalweg

Der PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/Akt (auch PKB, *protein kinase B*)-Signalweg ist involviert in eine Reihe von zellulären Prozessen wie Proliferation, Migration und Apoptose (Manning und Cantley, 2007). Die Hyperaktivierung von PI3K/Akt ist assoziiert mit der Entstehung und Progression verschiedenster Tumorarten (Restuccia und Hemmings, 2010).

Externe Stimuli aktivieren RTKs, GPCRs oder auch Integrine, die die PI3K zur Zellmembran rekrutieren, wo sie über ihre Untereinheiten p85 und p110 aktiviert wird. Die aktive PI3K phosphoryliert Phosphatidylinositol-4,5-bis-Phosphat (PIP₂) an der 3'-Position seines Inositolrings, wodurch eine Konvertierung von PIP₂ zu PIP₃ stattfindet. Erhöhte PIP₃ Level im Zytoplasma führen zur Rekrutierung und Aktivierung von Akt an der Zellmembran (Cantley, 2002). Akt wiederum aktiviert je nach Stimulus und Zelltyp zahlreiche weitere Faktoren wie z.B. mTor (*mammalian target of rapamycin*), die die verschiedenen Zellprozesse wie Proliferation und Migration regulieren (Manning und Cantley, 2007).

In Knockout-Studien konnte gezeigt werden, dass Akt eine kritische Rolle in der Entwicklung und Differenzierung der murinen Plazenta hat. So führte die homozygote Deletion der Akt1-Isoform in Mäusen zu einer verminderten Anzahl proliferativer Trophoblastzellen (Yang et al., 2003). Auch im humanen Trophoblasten wurde die Aktivierung von PI3K/Akt nachgewiesen (Johnstone et al., 2005). Eine Rolle dieses Signalweges in der Trophoblastmigration/-invasion belegen Studien an verschiedenen Trophoblastzelllinien. So führte die Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF-II und HGF und auch mit dem Hormon hCG über die Aktivierung von PI3K/Akt zu einer erhöhten Zellmigration (Cartwright et al., 2002b; Qiu et al., 2004b; Qiu et al., 2005; Prast et al., 2008). Zusätzlich konnte die Involvierung von mTOR über den Einsatz eines spezifischen Inhibitors nachgewiesen werden (Qiu et al., 2004a). Wie auch beim MAPK/ERK-Signalweg führte die Aktivierung von PI3K/Akt ebenfalls zu einer erhöhten Sekretion von MMP-2 und MMP-9 (Qiu et al., 2004b; Prast et al., 2008), was wiederum einen Hinweis auf die Rolle dieses Signalweges für die Regulation der Trophoblastinvasion darstellt.

1.1.2.3 Integrine

Integrine sind Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit, die je nach Zelltyp und Funktion unterschiedlich zusammengesetzt sind. Sie spielen neben ihrer Funktion als Zelladhäsionsmoleküle, welche die EZM an das Aktin-Zytoskelett koppeln oder aber an Rezeptoren angrenzender Zellen binden (Hynes, 1987; Albelda und Buck, 1990), auch eine Rolle in der Weiterleitung von Signalen, die verschiedene Zellprozesse wie Differenzierung, Proliferation und Migration regulieren (Hynes, 2002; Schuppan und Ocker, 2003). Sie werden über eine Art von Recycling-Mechanismus endozytotisch an einer Seite der Zelle internalisiert und über

Exozytose an anderer Stelle wieder zur Membran gebracht, was dazu beiträgt, dass die Zelle in eine bestimmte Richtung migrieren kann (Caswell und Norman, 2006).

Die Integrinuntereinheiten bestehen aus einer großen extrazellulären Domäne, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist, einer Transmembran-Domäne sowie einer aus 20-70 Aminosäuren bestehenden kleinen zytoplasmatischen Domäne (Hynes, 1992; Sastry und Horwitz, 1993). Die Weiterleitung von Signalen durch Integrine funktioniert in beide Richtungen: die Bindung von EZM-Faktoren an die extrazelluläre Domäne (über ein Arg-Gly-Asp (RGD) Bindemotiv) löst Signale aus, die von den Integrinen in die Zelle weitergegeben werden („outside-in signaling“), wohingegen intrazelluläre Signale über die zytoplasmatische Integrindomäne nach außen weitergegeben werden („inside-out signaling“) (Williams et al., 1994; Clark und Hynes, 1997; Howe et al., 1998). In beiden Fällen bilden die Integrine Kluster, die auf der extrazellulären Seite mit EZM-Proteinen und auf der intrazellulären Seite mit Proteinen des Zytoskeletts assoziiert sind (Burrige und Chrzanowska-Wodnicka, 1996).

Zu den intrazellulären Signalkaskaden bzw. -molekülen, die über Integrine aktiviert werden und die Proliferation, Migration, Invasion und andere Zellprozesse regulieren, gehören u.a. FAK (*focal adhesion kinase*), Src (*sarcoma kinase*), JNK, MAPK/ERK1/2 und PI3K/Akt (Klemke et al., 1997; Shaw et al., 1997; Sieg et al., 2000; Cary et al., 2002; Huang et al., 2003).

Bei der Regulation der Trophoblastinvasion spielen neben der Balance von pro- und anti-invasiven Faktoren, insbesondere des MMP/TIMP und des uPA/PAI Systems (Feinberg et al., 1989; Lala und Hamilton 1996; Bischof et al., 2000), auch Integrine eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Trophoblastzellen entlang des invasiven Differenzierungsweges ihr Repertoire an Integrinen ändern (Damsky et al., 1992; Aplin, 1993; Damsky et al., 1994). Die Stammzellen des Zytotrophoblasten, die durch fortlaufende Proliferation und Fusion mit dem Synzytiotrophoblasten das Zottenwachstum vorantreiben, zeigen eine hohe Expression von Integrin $\alpha 6 \beta 4$. Der erste Schritt der Trophoblast-Differenzierung, die Bildung von Zellsäulen bestehend aus proliferierenden EVT-Zellen, zeichnet sich durch die Hochregulation von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ aus. Die Zellen, die die Zellsäulen verlassen und als nicht mehr proliferierende interstitielle EVT-Zellen durch die Uteruswand in die Dezidua invadieren, sind neben Integrin $\alpha 5 \beta 1$ durch eine Hochregulation von Integrin $\alpha 1 \beta 1$ charakterisiert, wohingegen Integrin $\alpha 6 \beta 4$ herunterreguliert ist. Die Rolle von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ in der

Trophoblastmigration/-invasion konnte anhand von Untersuchungen an EVT-Zellen *in vitro* gezeigt werden, die nach Blockade der Integrine durch spezifische $\alpha 5 \beta 1$ -Antikörper nicht mehr in der Lage waren zu migrieren (Irving und Lala, 1995; Gleeson et al., 2001).

1.1.3 Die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 als Modell für den humanen extravillösen Trophoblasten

Die humane maligne Trophoblastzelllinie Jeg3 wurde 1971 etabliert (Kohler und Bridson, 1971) und ist ein Modell für den invasiven extravillösen Trophoblasten der frühen Plazenta (Grümmer 1991). Jeg3 Zellen entstammen einem Chorionkarzinom, einem seltenen hochinvasiven Tumor des Trophoblasten. Diese epitheliale Tumorart hat eine unregelmäßige zottenartige Oberfläche und besteht sowohl aus mononukleären Trophoblastzellen als auch aus mehrkernigen Synzytiotrophoblastzellen, die morphologisch den primitiven Trophoblasten darstellen (Shih le und Kurman, 2002).

Durch subkutane Injektion in Nacktmäuse konnte gezeigt werden, dass Jeg3 Zellen Zugang zu den murinen Blutgefäßen erlangten und, ähnlich wie bei der Modulation der maternalen Spiralarterien durch EVT-Zellen, die Endothelzellen ersetzten und große blutgefüllte Lakunen bildeten (Zhou et al., 1997; Grümmer et al., 1999). Dieser Mechanismus ist vergleichbar mit der normalen Entwicklung der hämochorialen Plazenta, welche auch durch die Bildung von mit maternalem Blut gefüllten Lakunen gekennzeichnet ist, das die Trophoblastzotten umspült.

Neben den morphologischen Merkmalen weisen Jeg3 Zellen verschiedene molekulare Charakteristika benigner Trophoblasten auf. Dazu gehören die Sekretion von Plazentahormonen wie hCG, Östradiol und Progesteron (Pattillo et al., 1968; Benveniste et al., 1978) und die Expression proteolytischer Enzyme wie Urokinase, Kollagenase Typ IV und Matrixmetalloproteasen, die EVT-Zellen dazu befähigen die Basalmembran zu durchdringen und durch die extrazelluläre Matrix zu migrieren (Strickland und Richards, 1992).

Abseits aller Gemeinsamkeiten maligner und benigner Trophoblastzellen besteht ein wesentlicher Unterschied *in vivo*: im Gegensatz zu dem unkontrollierten Wachstums- und Invasionsverhalten von Tumorzellen wie den Jeg3 Zellen unterliegt der Vorgang

der Trophoblastinvasion in das maternale Gewebe während der Implantation und Plazentation einer strengen zeitlichen und räumlichen Regulation durch embryonale sowie maternale Faktoren, die für die normale Entwicklung der Plazenta unabdingbar ist (Strickland und Richards, 1992; Lala und Hamilton, 1996; Bischof et al., 2000; Lala et al., 2002). Neben der Untersuchung von primären Trophoblastzellen und benignen Trophoblastzelllinien, kann der Vergleich zu malignen Trophoblastzellen wie der Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 Aufschluss über die Mechanismen des kontrollierten Wachstums- und Migrations-/Invasionsverhalten des benignen Trophoblasten geben (Grümmer et al., 1994; Ferretti et al., 2007; Bilban et al., 2010).

1.2 Die CCN-Proteinfamilie

Die Familie der CCN-Proteine wurde 1999 erstmals beschrieben (Brigstock et al., 1999) und umfasst 6 Mitglieder, die induziert durch mitogene Wachstumsfaktoren oder Onkogene als sekretierte 35-55 kDa große Proteine in Vertebraten identifiziert wurden. Das Akronym CCN setzt sich zusammen aus den Namen der ersten drei beschriebenen Mitglieder **CYR61** (*cysteine rich 61*; CCN1) (O'Brien et al., 1990), **CTGF** (*connective tissue growth factor*; CCN2) (Bradham et al., 1991) und **NOV** (*nephroblastoma overexpressed*; CCN3) (Joliot et al., 1992). Die WISP-Proteine (*Wnt-induced secreted protein 1-3*; CCN4-6) wurden bisher als letzte CCN-Familienmitglieder identifiziert (Pennica et al., 1998). Bei allen CCN-Proteinen handelt es sich um matrizelluläre Proteine mit vielfältigen Funktionen in unterschiedlichsten Zelltypen. Sie spielen eine Rolle in der Proliferation, Migration, Differenzierung, Adhäsion, Wundheilung, Angiogenese und Tumorgenese (Perbal, 2001). Alle Mitglieder zeigen einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau (siehe Abb. 1.5). Einem Amino-terminalen (NT) Sekretionssignal folgen vier konservierte Domänen, die alle von getrennten Exons kodiert werden: eine IGFBP-ähnliche Domäne (IGFBP; *insulin-like growth factor binding protein*), eine Von Willebrand-Faktor-ähnliche Domäne (VWC; *Von Willebrand factor type C repeat*), eine Thrombospondin-ähnliche Domäne (TSP-1; *thrombospondin type 1 repeat*) und eine Cystein-reiche C-terminale Domäne (CT; *cystein knot containing family of growth regulators*). Mit Ausnahme von CCN5, welches keine CT-Domäne besitzt, ist dieser modulare Aufbau bei allen CCN-Mitgliedern gleich. Die Variation der einzelnen

Mitglieder liegt in einer kurzen Sequenz hinter der VWC-Domäne, die sich in Länge und Aminosäure-Zusammensetzung unterscheidet.

1.2.1 NOV (CCN3)

NOV wurde identifiziert als ein aberrant exprimiertes Gen in MAV-1 (*myeloblastosis associated virus-1*)-induzierten Nephroblastomen beim Huhn und als Integrationsstelle für das MAV-1 Retrovirus im Affen-Nephroblastom charakterisiert (Joliot et al., 1992). Das NOV-Protein ist abhängig vom Zelltyp 46-55 kDa groß und weist zwei N-Glykosylierungsstellen auf (siehe Abb. 1.4; Chevalier et al., 1998; Lazar et al., 2007). NOV wird in vielen verschiedenen Geweben exprimiert, zu denen Leber, Knochen, Knorpel, das zentrale Nervensystem und Muskelgewebe gehören (Chevalier et al., 1998; Su et al., 1998; Katsube et al., 2001; Kocialkowski et al., 2001; Perbal, 2001). Eine im Jahr 2010 publizierte Knockout-Studie zeigt, dass die homozygote Deletion des NOV-Gens bei Mäusen unter anderem mit einer verminderten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen assoziiert ist (Shimoyama et al., 2010).

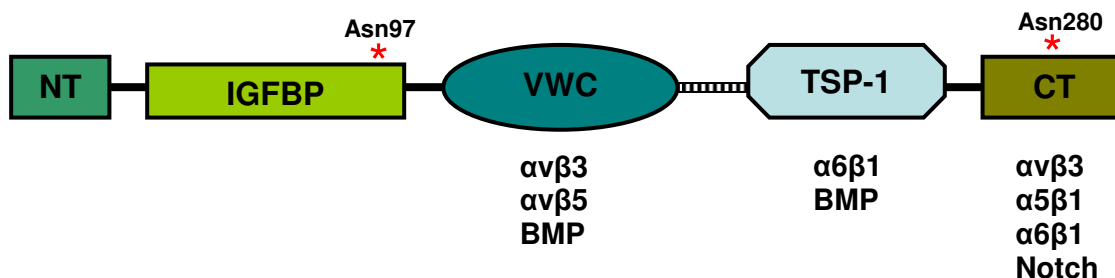


Abb.1.4: Schema des modularen Aufbaus von CCN-Proteinen am Beispiel von NOV (CCN3)

Dargestellt sind die zwei N-Glykosylierungsstellen von NOV (Asn97 und Asn280), sowie die wichtigsten NOV-Bindungspartner. Erklärung der CCN-typischen Domänen imText (Abschnitt 1.2). (modifiziert nach Katsube et al., 2009)

Bereits in der ersten Studie, in der NOV beschrieben wurde, konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des Proteins mit der Tumorgenese assoziiert ist (Joliot et al., 1992). Die N-Glykosylierung von NOV konnte in Untersuchungen an Tumoren der Nebenniere mit der Entstehung und Progression dieser Tumorart in Verbindung gebracht werden (Martinerie et al., 2001).

Zahlreiche Untersuchungen beschreiben eine antiproliferative Wirkung des sezernierten NOV-Proteins in verschiedensten Tumorzellen (Gupta et al., 2001; Sakamoto et al., 2002; Perbal, 2003; Fu et al., 2004; Gellhaus et al., 2004; Benini et al., 2005; Brigstock et al., 2005), wobei es jedoch auch Hinweise auf eine stimulierende Wirkung von NOV auf das Zellwachstum gibt, wie es z.B. an Prostata- und Nierenzellkarzinomen nachgewiesen wurde (Glukhova et al., 2001; Maillard et al., 2001). Die Rolle von NOV in der Regulation von Migrations- und Invasionsvorgängen der Zelle konnte am Beispiel von Chondrosarkomen, Mammakarzinomen und Ewing-Sarkomen gezeigt werden (Benini et al., 2005; Sin et al., 2008; Tzeng et al., 2011).

Seine spezifischen Funktionen in verschiedenen Zellarten vermittelt NOV, wie die anderen CCN-Proteine auch, über die Bindung von unterschiedlichsten Proteinen an die einzelnen CCN-Domänen (siehe Abb.1.5) (Bleau et al., 2005; Katsube et al., 2009) und die damit verbundene Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden. Studien zeigten die NOV-vermittelte Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges in humanen leukämischen Zelllinien (McCallum und Irvine, 2009) und die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges durch NOV in Chondrosarkomzellen und Osteosarkomzellen (Huang et al., 2011; Tzeng et al., 2011).

Bei den NOV-Bindungspartnern, die NOV-abhängige Zellfunktionen vermitteln, spielen neben BMPs (*bone morphogenetic proteins*) und Notch (Sakamoto et al., 2002; Minamizato et al., 2007; Shimoyama et al., 2010) auch verschiedene Integrine eine wichtige Rolle. So konnte z.B. gezeigt werden, dass NOV die Adhäsion von Endothelzellen über die Integrine $\alpha\beta3$ und $\alpha5\beta1$ vermittelte (Ellis et al., 2003). Adhäsions- und Migrationsstudien an humanen Endothelzellen der Nabelschnurvenen wiesen eine direkte Bindung von NOV an die Integrine $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$ und $\alpha5\beta1$ nach (Lin et al., 2003). In primären Fibroblasten wurde NOV zusätzlich als direkter Liganden von Integrin $\alpha6\beta1$ beschrieben und eine Rolle von NOV in der dermalen Wundheilung postuliert (Lin et al., 2005).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass NOV bei der Entwicklung der humanen Plazenta eine Rolle spielen. Die Expression des NOV-Proteins konnte in extravillösen Trophoblastzellen und in Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems nachgewiesen werden, wobei das Expressionslevel im Verlauf der Schwangerschaft kontinuierlich zunahm (Gellhaus et al., 2006; Gellhaus et al., 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass NOV auch in der malignen

Trophoblastzelllinie Jeg3 exprimiert wird (Gellhaus et al., 2004; Wolf et al., 2010). Die Hochregulierung der NOV-Expression über die Induktion des Gap Junction Proteins Connexin43 führte in Jeg3 Zellen zu einer drastischen Verminderung der Proliferationsfähigkeit (Gellhaus et al., 2004).

Eine Assoziation von NOV und dem Hypoxie-induzierbaren Faktor (Hif)-1 α zeigte eine Studie an plazentaren Explants des ersten Schwangerschaftstrimesters, welche unter Hypoxie kultiviert wurden (Wolf et al., 2010). Dabei war NOV insbesondere an der Invasionsfront der auf Matrigel kultivierten Explants sowie in den in das Matrigel invadierten Trophoblastzellen lokalisiert.

1.3 Präeklampsie

Die schwangerschaftsbedingte Erkrankung Präeklampsie ist mit einer Häufigkeit von 3-5 % eine der Hauptursachen für maternale und embryonale Mortalität weltweit (World Health Report, WHO 2005). Jährlich sterben mehr als 60.000 Frauen an den Folgen einer Präeklampsie. Außerdem stellt diese Erkrankung die Hauptursache für induzierte Frühgeburten dar (Redman und Sargent, 2005). Die maternalen Hauptsymptome der Präeklampsie sind Hypertonie, das Auftreten von Ödemen und eine Dysfunktion der Niere, die sich in einer Proteinurie äußert. Sie entstehen zumeist am Ende des zweiten Schwangerschaftstrimesters (Brown et al., 2001). Symptome, die den Embryo betreffen, sind eine häufig auftretende Wachstumsretardierung und eine verringerte Fruchtwassermenge aufgrund der plazentaren Insuffizienz (Brown et al., 2001; Sibai, 2003). Eine besonders schwerwiegende Form der Präeklampsie ist das sogenannte HELLP-Syndrom (*hemolysis, elevated liver enzymes, low platelet count*), dessen Name sich aus den Abkürzungen der zusätzlich zu den genannten Präeklampsie-typischen Symptomen (s.o.) auftretenden Krankheitsbefunde zusammensetzt: Hämolyse (H), erhöhte Leberenzym-Werte (EL) und eine verminderte Anzahl von Thrombozyten (LP) (Weinstein, 1982).

Man unterscheidet zwei Formen der Präeklampsie (Redman und Sargent, 2005): bei der schwerwiegenderen „early-onset“ Präeklampsie treten die Symptome vor der 34. SSW auf, während die „late-onset“ Präeklampsie nach der 34. SSW beginnt. Die bisher angewandten Therapien zielen auf die maternalen Symptome ab. Bei

schwerwiegenden Fällen ist die Einleitung der Geburt die einzige effizient angewandte Methode, um das Überleben von Mutter und Kind zu garantieren.

In der Literatur werden verschiedene Moleküle als biochemische Marker für die Diagnose der Präeklampsie diskutiert. Dazu gehören z.B. Hormone wie PAPP-A1 (*pregnancy associated plasma protein A1*), Activin A, Leptin und Adiponektin, oder auch andere im Blut von schwangeren Frauen vorkommende Faktoren wie PP13 (*placental protein 13*) und die löslichen Isoformen des Zelladhäsionsmoleküls P-Selektin, der MMP-verwandten Proteinase ADAM-12 (*a disintegrin and metalloproteinase 12*) und des CCN-Moleküls CTGF (CCN2; siehe Abschnitt 1.2). Aufgrund von teils kontroversen Studien, zu kleinen Patientenkohorten und bei einigen Kandidaten-Molekülen hohen interindividuellen Schwankungen konnte bisher jedoch kein Faktor gefunden werden, der als sicherer biochemischer Marker für die Früherkennung der Präeklampsie im ersten Schwangerschaftstrimester in Frage kommt. Eine Übersicht über die verschiedenen Faktoren und die in der Literatur bekannten Daten geben zwei kürzlich erschienene Reviews (Grill et al., 2009; Giguere et al., 2010).

1.3.1 Fehlentwicklung der präeklampsischen Plazenta

Die molekularen Mechanismen der Präeklampsie sind bis heute nicht gänzlich aufgeklärt. Da diese Erkrankung auch in Abwesenheit eines Fötus, wie bei der molaren Schwangerschaft, auftritt (Chun et al., 1964; Myatt, 2002), scheint die Plazenta eine Schlüsselfunktion in der Pathogenese der Präeklampsie innezuhaben. Wie in Abschnitt 1.1.1 beschrieben invadieren extravillöse Trophoblastzellen in die maternale Dezidua und ersetzen dort die Endothelzellen der Spiralarterien (siehe Abb. 1.2: endovaskuläre Trophoblastzellen), was zu einer Erweiterung der Gefäße und somit zu einem erhöhtem Blutfluss führt. Dieser Prozess ist für die ausreichende Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen essentiell.

Studien konnten zeigen, dass der Vorgang der Trophoblastinvasion und infolge dessen die Modulation der maternalen Spiralarterien bei der präeklampsischen Plazenta gestört ist (siehe Abb.1.5) (Zhou et al., 1993; Fisher, 2004). Bedingt durch die uteroplazentare Insuffizienz kommt es zu einer fetalen Wachstumsretardierung, was wiederum Auswirkungen auf die Angiogenese und die Entwicklung der Plazenta hat (Brosens et al., 1970; Lim et al., 1997).

VEGF, sowie PIGF (*placental growth factor*) erhöht war (Zhou et al., 2002). Auch die CCN-Proteine CYR61 und NOV sind im Zusammenhang mit Präeklampsie, insbesondere mit der „early-onset“ Form dieser Krankheit (siehe Abschnitt 1.3) beschrieben worden: im Gegensatz zum normalen Schwangerschaftsverlauf, der durch eine kontinuierliche Zunahme der CYR61- und NOV-Expression in der Plazenta gekennzeichnet war, konnten signifikant erniedrigte Expressionslevel beider CCN-Proteine in präeklaptischen Plazenten zwischen der 25. und 33. Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden (Gellhaus et al., 2006; Gellhaus et al., 2007). Außerdem zeigten Untersuchungen von Patientinnen mit diagnostizierter „early-onset“ Präeklampsie im Gegensatz zu Normalschwangeren eine Verminderung der CYR61- und NOV-Serumlevel (Gellhaus et al., 2007), was einen Hinweis auf eine mögliche Verwendung beider CCN-Proteine als diagnostische Marker gibt.

1.4 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Mechanismen des CCN-Proteins NOV, auf denen die Regulation von Proliferation, Migration und Invasion des humanen Trophoblasten basiert, untersucht werden. Als Modell für den invasiven extravillösen Trophoblasten wurde die humane Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 verwendet, die sowohl Eigenschaften des frühen Trophoblasten hinsichtlich seiner Invasivität, aber auch Tumormerkmale wie erhöhte Proliferation aufweist.

In Studien der Arbeitsgruppe Winterhager konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen zur Expression zweier verschiedener Formen des NOV-Proteins führte (Yang und Wagener et al., 2011). Da in der Literatur beschrieben wurde, dass die Polypeptid-Sequenz von NOV zwei putative N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginresten (Asn)97 und Asn280 aufweist (Chevalier et al., 1998), sollten im Rahmen dieser Arbeit zunächst die beiden in Jeg3 Zellen vorkommenden NOV-Formen auf ihre potentielle N-Glykosylierung hin untersucht werden.

Durch die Untersuchung von NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen sowie die Stimulierung parentaler Jeg3 mit rekombinanten Formen von glykosyliertem und unglykosyliertem NOV-Protein sollte die etwaigen Unterschiede in der Regulation von

NOV auf Trophoblastzellen analysiert werden. Dazu sollten vor allem das Proliferationsverhalten, die Migrations- und die Invasionsfähigkeit in Abhängigkeit beider NOV-Formen getestet werden. Außerdem sollten die Signalkaskaden sowie mögliche Rezeptoren identifiziert werden, die in Abhängigkeit von glykosyliertem und unglykosyliertem NOV die erwähnten Zellprozesse steuern.

Weiterhin sollte geklärt werden, ob sich NOV als diagnostischer Marker für die Früherkennung der Präeklampsie eignet. Dazu sollte im Rahmen dieser Arbeit an gut charakterisierten Patientenproben (Blutserum, Plazentagewebe, Urin) NOV auf seine potentielle N-Glykosylierung und auf mögliche Veränderungen des Glykosylierungsmusters im Zusammenhang mit Präeklampsie hin analysiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Substanzen und Kits

Agarose, UltraPure	Invitrogen (Karlsruhe)
APS	Merck (Darmstadt)
BLOCK-iT Fluorescent Oligo	Invitrogen (Karlsruhe)
Brefeldin A	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA	Carl Roth (Karlsruhe)
Endoglycosidase-Buffer-Pack	New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)
DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DEPC	Carl Roth (Karlsruhe)
Dinatriumsalz	Merck (Darmstadt)
DMSO	Merck (Darmstadt)
DNA-Leiter Gene Ruler 100 bp plus	Fermentas (St. Leon-Rot)
10 x DNA-Polymerase-Puffer	GeneCraft (Köln)
10 x DNase I-Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
dNTP-Mix (je 10 mM)	GeneCraft (Köln)
DTT (0,1 M)	Invitrogen (Karlsruhe)
ELISA (ADAM-12 und NOV)	DRG Diagnostics (Marburg)
EDTA >99%	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromidlösung 1%	Serva (Heidelberg)
Ethanol absolut	Riedel-de Haën (Seelze)
Essigsäure 100%	Carl Roth (Karlsruhe)
E.Z.N.A. Total RNA Kit	Omega Bio-tek (Norcross, GA, USA)
FCS	Biochrom AG (Berlin)
G418	Biochrom AG (Berlin)
Glycerin	Riedel-de Haën (Seelze)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe)
HPLC-H ₂ O	Merck (Darmstadt)
INTERFERin Polyplus-transfection	(New York, NY, USA)
Kaliumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth (Karlsruhe)
L-Glutamin	Invitrogen (Karlsruhe)
Luminol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

LY294002	Cell Sign. Technologies (Danvers, MA, USA)
Matrigel Phenolrot-frei	Becton Dickinson (Bedford, MA, USA)
MEM-EARLES w/o L-Glutamine	Invitrogen (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Methanol pro analysis	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
M-MLV-RT	Invitrogen (Karlsruhe)
Milchpulver fettfrei	TSI (Zeven)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Monensin	BioLegend (San Diego, CA, USA)
Mowiol	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumacetat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumazid	Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Natriumfluorid	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumphosphat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Oligo(dT)18 Primer (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Invitrogen (Karlsruhe)
PBS	Biochrom (Berlin)
PD98059	Cell Sign. Technologies (Danvers, MA, USA)
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Phosphatase Inhibitor PhosSTOP	Roche Diagnostics (Mannheim)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Weiterstadt)
2-Propanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Proteasehemmer Complete EDTA-free	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein-Standard PAGE Ruler	Fermentas (St. Leon-Roth)
ProteoSpin Urine Protein Concentration Kit	Norgen Biotek (Ontario, Canada)
rekombinantes humanes NOV	PeproTech (Hamburg)
rekombinantes humanes NOV	R&D Systems Europe Ltd.
Rotiquant protein assay	Carl Roth (Karlsruhe)
Rotiphorese NF-Acrylamid/Bis-Lösung	Carl Roth (Karlsruhe)
5 x RT Puffer	Invitrogen (Karlsruhe)
Salzsäure 37%	Carl Roth (Karlsruhe)
siCONTROL non-targ. siRNA #2	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)

siGENOME duplex, hIntegrin $\alpha 5$	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
5 x siRNA Puffer	Dharmacon (Lafayette, CO, USA)
SDS ultra pure >99%	Carl Roth (Karlsruhe)
TEMED	Serva (Heidelberg)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween 20	Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Hybond-C Nitrocellulosemembran	Amersham Biosciences (Freiburg)
Whatman-Papier, 3 mm	Biometra (Göttingen)
X-Ray Filme Super RX	Fuji Medical (Düsseldorf)
Zellkulturflaschen, -platten, -schalen	Falcon (Heidelberg)

2.1.3 Laborgeräte

Brutschrank US Autoflow	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Blotkammer TransBlot SD	Bio-Rad (München)
Geldokumentationssystem Herolab SU-1	Herolab Laborgeräte (Wiesloch)
Gelelektrophoresekammer	Medizintechnik Universitätsklinikum Essen
Homogenisator Polytron PT 3100	KINEMATICA AG (Luzern, Schweiz)
Konfokales Laser-Scan Mikroskop (TCS SP5)	Leica(Wetzlar)
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss (Oberkochen)
Microplate Reader FLUOstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg)
PCR-Maschine T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen)
pH-Meter HI 9025	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)
Photometer BioPhotometer plus	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsgeber PHERO-stab. 500	Biotec-Fischer (Reiskirchen)
Real-time PCR-Maschine ABI Prism 7300	Applied Biosystems (Weiterstadt)
SDS PAGE Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Sterilbank Class II	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Western Blot Elektrophoresekammer	Bio-Rad (München)
Zellzählgerät CasyCounter CASY®1	Schärfe System (Reutlingen)
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg)

Zentrifuge: Hettich Rotina 38R

Hettich (Tuttlingen)

2.1.4 Enzyme

DNA Polymerase Biotherm (5 U/μl)

GeneCraft (Köln)

DNase I (1 U/μl)

Invitrogen (Karlsruhe)

Endo Hf (1000000 U/ml)

New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

M-MLV-RT(200 U/μl)

Invitrogen (Karlsruhe)

PNGase F (500000 U/ml)

New England Biolabs (Ipswich, MA, USA)

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Klonalität	Verdünnung	Applikation	Hersteller
Kaninchen anti-β-Aktin	polyklonal	1:1000	WB	Sigma Aldrich
Kaninchen anti-Akt	polyklonal	1:1000	WB	Cell Sign. Technologies
Kaninchen anti-phosphoAkt	monoklonal	1:2000	WB	Cell Sign. Technologies
Kaninchen anti-cleaved Notch	monoklonal	1:1000	WB	Cell Sign. Technologies
Kaninchen anti-phosphoEGFR	monoklonal	1:1000	WB	Cell Sign. Technologies
Kaninchen anti-FAK	polyklonal	1:1000	WB	Santa Cruz Biotech.
Kaninchen anti-phosphoFAK	polyklonal	1:1000	WB	Cell Sign. Technologies
Maus anti-p44/42 MAPK(ERK1,2)	monoklonal	1:2000	WB	R&D Systems
Maus anti-phospho-p44/42 MAPK(pERK1,2)	monoklonal	1:2000	WB	Cell Sign. Technologies
Maus anti-Hif-1α	monoklonal	1:500	WB, IZC	BD Biosciences
Ziege anti-NOV	polyklonal	1:500, 1:50	WB, IZC	R&D Systems
Maus anti-Integrin α5β1	monoklonal	1:100	IZC	Chemikon
Kaninchen anti-Integrin α5	polyklonal	1:5000	WB	Chemikon
Kaninchen anti-Integrin β	monoklonal	1:5000	WB	Chemikon
Ziege anti-Kaninchen-HRP	polyklonal	1:10000	WB	Santa Cruz Biotech.
Esel anti-Ziege-HRP	polyklonal	1:10000	WB	Santa Cruz Biotech.
Ziege anti-Maus-HRP	polyklonal	1:10000	WB	Santa Cruz Biotech.
Esel anti-Ziege Cy3-konjugiert	polyklonal	1:200	IZC	MoBiTech
anti-Maus Alexa Fluor@488	polyklonal	1:200	IZC	MoBiTech

Tab.1 verwendete Antikörper (WB: Western Blot; IZC: Immunzytochemie)

2.1.6 Oligonukleotide

Primer forward reverse	Accession number	Sequenz (5'→3')	Position	Fragment größe (Bp)
β-aktin f β-aktin r	NM_001101	ACC TTC AAC ACC CCA GCC ATG TAC G CTG ATC CAC ATC TGC TGG AAG GTG G	302-326 491-515	214
hif-1α f hif-1α r	NM_001530	GCT GGC CCC AGC CGC TGG AG GAG TGC AGG GTC AGC ACT AC	1601-1620 1795-1814	214
integrin α5 f integrin α5 r	NM_002205.2	CAT CAA TGA TGT GGC CAT CG GGA TAT CCA TTG CCA TCC AG	1286-1306 1483-1503	198
integrin β1 f integrin β1 r	NM_002211.3	CGA GGT CAT GGT TCA TGT TG TCC CAT TTG GCA TTC ATT TT	2354-2377 2548-2568	195
mmp-2 f mmp-2 r	NM_004530.2	ATG ACA GCT GCA CCA CTG AG ATG ACA GCT GCA CCA CTG AG	1209-1229 1382-1402	174
mmp-9 f mmp-9 r	NM_004994.2	TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG GCC ATT CAC GTC GTC CTT AT	1155-1175 1333-1353	179
nov f nov r	NM_002514	CAC GGC GGT AGA GGG AGA TA GGG TAA GGC CTC CCA GTG AA	527-546 758-777	251

Tab.2 Primersequenzen. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

2.1.7 Zelllinie

In dieser Arbeit wurde mit der humanen Chorionkarzinom-Zelllinie Jeg3 (ATCC HTB-36) gearbeitet. Diese wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) erworben. Die Zelllinie ist eine von sechs klonal entstandenen Linien, welche aus dem Erwin-Turner Tumor von Kohler und Bridson (1971) isoliert wurden.

2.1.8 Patientenproben

Alle in dieser Arbeit verwendeten Patientenproben (Serum, Urin, Plazentagewebe) stammen aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Essen. Die Entnahme bzw. Akquisition der Patientenproben war von der Ethikkommission des Universitätsklinikums genehmigt worden (Ethikantrag-Nr. 08-3684; 15.06.2008). Von jeder Patientin wurde bei Zustimmung zur wissenschaftlichen Studie vor der Proben- und Gewebeentnahme eine schriftliche Einverständniserklärung entgegengenommen. Jede Patientin erhielt vor dem Eingriff und der Gewebeentnahme Informationsmaterial über die wissenschaftliche Studie, welches die Richtlinien und die Zustimmung der deutschen wissenschaftlichen Ethikkommission enthielt, und wurde zusätzlich mündlich aufgeklärt.

2.1.9 Software und Datenbanken

ABI Prism 7300 (Applied Biosystems, Weiterstadt)

SPSS Software, Version 16.0

TINA 2.09g (raytest, Straubenhardt)

GraphPad Prism 5

BLAST: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>

2.2 Methoden

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Aqua bidest. angesetzt.

2.2.1 Kultivierung von parentalen Jeg3 Zellen

Die Inkubation der verwendeten Chorionkarzinomzellen erfolgte bei 37°C unter 5% CO₂ Partialdruck in einer wassergesättigten Atmosphäre. Die verwendeten Lösungen wurden vor Gebrauch steril filtriert. Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden an Sterilbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit 0,14 ml Medium pro cm² versorgt und kontinuierlich in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, damit eine kultivierungsbedingte Selektion von Zellklonen verhindert wurde. Die Versorgung der Zellen mit frischem Medium erfolgte dreimal in der Woche. Damit die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten werden konnten, wurden diese bei ca. 70% Konfluenz passagiert.

Jeg3-Nährmedium: MEM-EARLES w/o L-Glutamine; 10% (v/v) FCS; 2,4 mM L-Glutamin; 5% Penicilin-Streptomycin

2.2.2 Kultivierung von stabil transfizierten Jeg3 Zellen

Die stabil mit NOV transfizierten Jeg3 Zellen (im nachfolgenden Text als Jeg3/NOV bezeichnet) wurden mit Hilfe des Resistenzmarkers G418 selektiert. Die weitere Kultivierung erfolgte wie bei den parentalen Zellen. Das Nährmedium wurde dabei mit G418 versetzt, um ausschließlich die Kultivierung der transfizierten Zellklone zu garantieren.

Jeg3/NOV-Selektionsmedium: MEM-EARLES w/o L-Glutamine; 10% (v/v) FCS; 2,4 mM L-Glutamin; 0,25 µg/ml G418

2.2.3 Passagieren von Chorionkarzinomzellen

Beim Passagieren der Zellen wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit 0,07 ml Moscona-Lösung pro cm² gewaschen. Danach wurde die Lösung wieder entnommen und die Zellen mit 0,014 ml Trypsin-EDTA pro cm² für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert, um die adhärennten Zellen abzulösen. Durch Zugabe von frischem Medium wurde diese Reaktion gestoppt und die Zelllösung wurde resuspendiert um die Zellen zu vereinzeln. Je nach weiterer Verwendung wurden die Zellen in entsprechenden Verhältnissen passagiert.

Moscona (pH = 7,4): 140 mM NaCl; 4 mM KCl; 0.4 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 0,2 mM KH₂PO₄; 12 mM NaHCO₃; 9 mM D-Glucose x H₂O

2.2.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des CasyCounter Systems bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und ein Aliquot von 50 µl in 10 ml CasyTon-Lösung verdünnt. Die Programmparameter des CasyCounters wurden so gewählt, dass alle Zellen mit einem Durchmesser von 9-90 µm erfasst und gezählt wurden.

CasyTon-Lösung (pH 7,3-7,4): 136 mM NaCl; 1 mM Na₂-EDTA; 5,4 mM KCl; 1,6 mM; NaH₂PO₄; 3,7 mM Na₂HPO₄; 7,1 mM NaF

2.2.5 Kryokonservierung und Rekultivierung von Chorionkarzinomzellen

Für die Langzeitlagerung der Zellen wurden diese zunächst trypsinisiert (siehe 2.2.1.3). Die Zellsuspension wurde 3 min bei 800 rpm zentrifugiert, das entstandene Zellsediment in 1,8 ml Medium resuspendiert und unter Zugabe von 5% DMSO in ein 2 ml-Kryoröhrchen überführt. Die Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Rekultivierung wurden die in Kryomedium (Nährmedium + 5% DMSO) eingefrorenen Zellen mit auf 37 °C vorgewärmtem Nährmedium überschichtet und schnellstmöglich in eine T-25 Zellkulturflasche mit insgesamt 10 ml Medium

überführt. Um den zytotoxischen Effekt des DMSO zu minimieren, wurde nach spätestens 24 h das Medium gewechselt.

2.2.6 Behandlung mit rekombinantem NOV und verschiedenen Inhibitoren

Die parentalen Jeg3 Zellen wurden mit zwei verschiedenen Formen von rekombinantem NOV (rNOV) behandelt, um die Funktionen von NOV bei bestimmten Zellvorgängen wie Proliferation und Migration zu analysieren. Dazu wurden die Zellen zunächst 24 h in serumfreien Medium kultiviert, um eine in Bezug auf Zellzyklus und Wachstumsphase möglichst homogene Zellpopulation zu erhalten. Anschließend wurde dem Medium verschiedene Konzentrationen an rNOV zugesetzt (500 ng/ml – 1 µg/ml gelöst in PBS mit 0,1 % BSA) und die Zellen für Zeitintervalle von 15 min bis 72 h inkubiert. Optimale Wachstumsbedingungen wurden garantiert, indem die Zellen täglich mit frischem Medium und rNOV bzw. Lösungsmittel versorgt wurden. (siehe Proliferation, Zymogramm etc.).

Für die Analyse der durch NOV aktivierten Signalkaskaden wurden sowohl die parentalen Jeg3, als auch die Jeg3/NOV Zellen mit Substanzen behandelt, die verschiedene Signalwege in der Zelle blockieren. Die Blockierung des MAPK/ERK-Signalweges erfolgte durch den Mek-Inhibitor PD98059 (50 µM gelöst in DMSO), der die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert. Der PI3K/AKT-Signalweg wurde durch den PI3-Kinase Inhibitor LY294002 (50 µM gelöst in DMSO) blockiert. Nach jeweils einstündiger Vorinkubation mit den Inhibitoren und der Behandlung der parentalen Jeg3 Zellen mit rekombinantem NOV wurden die so manipulierten Zellen für nachfolgende Versuche benutzt.

Die Blockierung von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ erfolgte durch Inkubation der Zellen mit einem $\alpha 5 \beta 1$ -Antikörper (als Kontrolle diente ein ungekoppelter Maus IgG Antikörper) bzw. einem RGD-Peptid (Kontrolle: Peptid ohne RGD-Sequenz).

Um die Funktionen der verschiedenen NOV-Formen in den Jeg3/NOV Zellen weiter zu differenzieren, wurden Substanzen eingesetzt, die die Sekretion von NOV aus der Zelle verhindern. Die Effektivität von Monensin und Brefeldin A (beides gelöst in DMSO) wurde durch die Reduktion von NOV im Medium bzw. durch die Akkumulation von NOV im Zelllysate mittels Western Blot nachgewiesen.

Um bei der Behandlung der Zellen mit den verschiedenen oben genannten Substanzen bzw. rekombinanten Proteinen einen Einfluss des Lösungsmittels auszuschließen, wurde den jeweiligen Kontrollproben nur das Lösungsmittel (DMSO bzw. 0,1 % BSA in PBS) zugesetzt.

2.2.7 Transfektion mit siRNA

Es wurden jeweils 1×10^5 Zellen in 6-Lochplatten ausgesät und bis zum Erreichen der gewünschten Zelldichte (30-50%) inkubiert. Der Transfektionsansatz bestand aus 50–150 nM der jeweiligen siRNA (als Kontrolle diente eine siRNA mit unspezifischer Sequenz) und 8 μ l des Transfektionsreagenzes INTERFERin in insgesamt 200 μ l serumfreiem Medium. Dieses Gemisch wurde 10 sec. gevortext und für die Komplexbildung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium in den 6-Lochplatten gewechselt und anschließend der siRNA-Ansatz auf die Zellen gegeben. Die Effektivität und Dauer der Herunterregulation auf Proteinebene wurde mittels Western Blot untersucht.

2.2.8 Bestimmung der Proliferationsrate

Die Proliferation der Chorionkarzinom Zellen unter verschiedenen Bedingungen wurde mit Hilfe des CasyCounter Systems bestimmt (siehe 2.2.1.4). Dazu wurden zunächst 1×10^4 Zellen in 12-Lochplatten ausgesät und dann an den drei darauffolgenden Tagen jeweils nach 24 h gezählt. Aus den erhaltenen Zellzahlen wurde die Proliferationsrate der Zellen ermittelt. Um die Zellen über drei Tage unter konstanten Bedingungen kultivieren zu können, wurde das Medium täglich gewechselt. Die Zellvitalität wurde mittels Lichtmikroskops visuell überprüft.

2.2.9 Migrations- und Invasionsassay

Die Migrations- und Invasionseigenschaften der Chorionkarzinomzellen unter verschiedenen Bedingungen wurden in BD Falcon™ Zellkultureinsätzen in 24-Lochplatten (BD Biosciences) durchgeführt. Die Membran der verwendeten Einsätze hatte eine Porengröße von 8 μ m. Für die Invasion wurden diese Membranen mit Matrigel (1:5 verdünnt in MEM) beschichtet und eine Stunde bei 37°C vorinkubiert. Die so vorbereiteten Zellkultureinsätze wurden mit 1×10^5 Zellen in 500 μ l

serumfreien Medium befüllt (für die Migration wurden unbeschichtete Einsätze verwendet). Anschließend wurde die untere Kammer mit 750 µl serumhaltigem Medium befüllt und die Zellen 24 h inkubiert.

Die Auswertung der Migration/Invasion erfolgte mittels einer Calcein AM Färbung. Der Farbstoff Calcein AM wurde in Dissoziationspuffer verdünnt (1,2 µg/ml) um die Zellen, die an der Unterseite der Membran haften, abzulösen. Dazu wurden die Zellkammern zunächst dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 300 µl des Calcein AM/ Dissoziationspuffer -Gemisches 1 h bei 37 °C inkubiert. Jeweils 2 x 100 µl der so erhaltenen Zellsuspension wurde in eine 96-Lochplatte überführt und in einem Multiplate Reader bei 485 nm Extinktion und 520 nm Emission gemessen. Um die erhaltenen Werte auf die Zellzahl beziehen zu können wurde eine Standardreihe von 250-4000 Zellen in je 100 µl Calcein AM/ Dissoziationspuffer hergestellt, die in einem Dreifachansatz in die 96-Lochplatte pipettiert und mitgemessen wurde.

Um den Einfluss des rekombinanten NOV bei der Migration und Invasion zu untersuchen wurden die Zellen zunächst 24 h mit 500 ng/ml rNOV im Medium vorinkubiert und der anschließende Assay mit je 500 ng/ml rNOV in der oberen und unteren Kammer durchgeführt.

Dissoziierungspuffer (pH 7,4): 5 mM EDTA in PBS

2.2.10 Immunzytochemie

Die Zellen wurden in 12- oder 24-Lochplatten auf sterile 12-15 mm Deckgläschen ausgesät. Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte (50-70%) wurden die Zellen zweimal mit Moscona gewaschen und mit eiskaltem Methanol 10 min bei 4 °C fixiert. Es folgten 2-3 Waschschrte um das Methanol zu entfernen und anschließend eine 15 minütige Inkubation bei RT in 1% BSA/PBS, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Bei der darauf folgenden Antikörper-Inkubation wurden der jeweils verwendete Primär- und fluoreszenz-gekoppelte Sekundär-Antikörper in 1% BSA/PBS verdünnt und 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C (Primär-Antikörper) bzw. 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln (Sekundär-Antikörper) mit den Zellen inkubiert. Zwischen den beiden Antikörper-Inkubationen erfolgten drei Waschschrte mit 1% BSA/PBS. Nachdem der ungebundene Sekundär-Antikörper durch dreimaliges Waschen vollständig entfernt war, wurden die Zellen zweimal mit reinem PBS gewaschen, danach kurz mit Methanol gespült und dann mit DAPI (0,1 µg/ml in

100% Methanol) 10 min bei Raumtemperatur gefärbt. Überschüssiges DAPI wurde durch Spülen mit Aqua dest. entfernt und die Deckgläschen mit den Zellen nach unten mit Mowiol auf einem Objektträger fixiert. Bis zur vollständigen Aushärtung des Mowiols wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C gelagert und anschließend an einem konfokalen Laser-Scan Mikroskop fotografiert und ausgewertet.

2.2.11 Proteinextraktion aus Chorionkarzinomzellen

Die Zellen wurden kurz mit Moscona gewaschen, um Mediumreste und Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde je nach Größe des Versuchsansatzes 80-150 µl NETN-Puffer auf die Zellen pipettiert und diese mit einem sterilen Zellschaber abgekratzt. Die so entstandene Zellsuspension wurde mindestens 20 min auf Eis inkubiert und danach 10 min bei 4°C und 130000 rpm abzentrifugiert. Das dabei entstehende Sediment wurde entfernt und der proteinhaltige Überstand bei -80°C gelagert bzw. für nachfolgende Messungen verwendet.

NETN-Puffer: 20 mM Tris pH 8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,4 % Nonidet-P40; 1 Tablette Proteasehemmer Inhibitor Complete EDTA-free; 1 Tablette Phosphatase Inhibitor PhosSTOP

2.2.12 Proteinextraktion aus Plazentagewebe

Die Gewebefragmente wurden in 2 ml-Reaktionsgefäße mit je 600 µl RIPA-Puffer gegeben und mit einem Homogenisator zerkleinert. Um die Zellen vollständig aufzuschließen, wurde das Homogenat zusätzlich mehrmals mit einer Injektionskanüle (20G) aufgezogen. Nach dieser Prozedur folgte ein 30 minütiger Inkubationsschritt auf Eis und eine abschließende 10 minütige Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm, um die Zelltrümmer zu entfernen.

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl; 10 mM Tris pH 7.2; 0.1% SDS; 1% Triton X-100; 1% Deoxycholate; 5 mM EDTA; 1 Tablette Proteasehemmer Complete EDTA-free

2.2.13 Aufarbeitung von Zellüberständen

Um das von den Zellen sekretierte NOV im Western Blot nachweisen zu können, musste das Medium mit Heparin-Agarose behandelt werden. Dazu wurden die Zellen zunächst 48 h in serum-freiem Medium inkubiert. 1 ml des so konditionierten

Mediums wurde, nach Entfernung vorhandener Zelltrümmer durch Zentrifugation, mit 200 µl Heparin-Agarose-Suspension vermischt und über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die Heparin-Agarose-Kügelchen mit den daran gebundenen Proteinen wurden am nächsten Tag abzentrifugiert, mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min aufgekocht, um die Bindungen zu lösen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden 10-20 µl der so behandelten Proben für die in 2.2.16 beschriebene SDS-Gelelektrophorese verwendet.

Um das konditionierte Medium für die in Abschnitt 2.2.19 beschriebene Endoglycosidase-Behandlung vorzubereiten, wurden 500 µl des Mediums mit drei Volumenanteilen eiskaltem Methanol gemischt und mindestens 30 min bei -80°C inkubiert. Die so gefällten Proteine wurden bei 4°C und 13000 rpm 15 min abzentrifugiert und das entstandene Proteinpellet nach dem Trocknen in 50 µl NETN-Puffer resuspendiert.

2.2.14 Aufarbeitung von humanen Serum- und Urinproben

Die Serumproben wurden in 1,5 ml-Aliquots aufgeteilt, um wiederholtes Einfrieren und Auftauen zu verhindern. Die Urinproben wurden sofort nach ihrer Entnahme abzentrifugiert, mit Proteasehemmern versetzt und eingefroren. Um zu verhindern, dass die im Urin vorhandenen Proteine durch Harnsäure oder andere Bestandteile wie Salze angegriffen werden, wurde ein Kit verwendet, welches die Proben entsalzt und gleichzeitig aufkonzentriert (ProteoSpin Urine Protein Concentration Kit, Norgen Biotek). Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerangaben.

2.2.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Rotiquant Protein Assays nach der Methode von Bradford [1976]. Je nach Probe wurde 1-5 µl Proteinextrakt mit Aqua dest. auf 800 µl aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Nach 5 min Inkubationszeit bei RT erfolgte die spektralphotometrische Messung der optischen Dichte bei 595 nm gegen eine Referenzlösung. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe einer BSA-Standardreihe mit 1, 2,5; 5; 10 und 20 µg/µl berechnet.

2.2.16 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinproben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Gelsystem [nach Laemmli 1970]. Dabei wurden die Proteine in einem 5 %igen Sammelgel bei 70 V fokussiert und dann in einem 10 %igen Trenngel bei 120-180 V ihrer Molekülgröße entsprechend aufgetrennt. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurden 8 µl eines vorgefärbten Größenstandards auf das Gel aufgetragen.

5% Sammelgel (10ml): 1,67 ml Acrylamid/bis (30%); 5,68 ml Aqua dest.; 2,5 ml Tris (0,5 M, pH 6,8); 100 µl SDS (10%); 5 µl TEMED; 100 µl APS (10%)

10% Trenngel (10 ml): 3,33 ml Acrylamid/bis (30%); 3,92 ml Aqua dest.; 2,5 ml Tris (1,5 M, pH 8,8); 100 µl SDS (10%); 5 µl TEMED; 100 µl APS (10%)

4 x SDS-Probenpuffer: 20% (v/v) 1 M Tris/HCl (pH 6,8); 27,7 µM SDS; 40% (v/v) Glycerin; 20% (v/v) β-Mercaptoethanol; 20% (v/v) Aqua dest.; 1 Spatelspitze Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8,8; 95 mM Glycin; 0.1% (w/v) SDS

2.2.17 Western Blot

Unmittelbar nach Abschluss der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran. Dazu wurde die Membran in kaltem Transferpuffer getränkt, luftblasenfrei auf das Gel gelegt und mit je 4 Lagen getränktem Whatmann-Papier aufeinander geschichtet. Dann wurden die Proteine 1,5 h mit 70 mA pro Gel geblottet. Die Effizienz des Transfers der Proteine auf die Membran wurde durch eine reversible Proteinfärbung (gebrauchsfertige 0,2%ige Ponceau S-Lösung in 3% TCA) überprüft.

Für den immunologischen Nachweis der transferierten Proteine wurde die Membran nach der Ponceau S-Färbung zunächst einige Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Die Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen erfolgte mit 5% Milchpulver in Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur. Die Verwendung der Primärantikörper in Bezug auf Inkubationszeiten und Verdünnungen richtete sich nach den jeweiligen Herstellerangaben. Vor und nach der einstündigen Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper wurde die Membran dreimal ca. 5 min mit Waschpuffer gespült.

Der indirekte Nachweis des Proteins über die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP erfolgte mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence Western

Blotting Kit, Pierce) gemäß Herstellerangaben, wobei die Visualisierung über das Belichten eines Röntgenfilms erfolgte.

Transfer-Puffer: 25 mM Tris base, 192 mM Glycin, 0,037% (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol

Waschpuffer (pH 7,6): 2 mM Tris base; 13,7 mM NaCl; 0,01% (v/v) Tween-20

2.2.18 Gelatin-Zymographie

Die Gelatin-Zymogramme dienten dem Nachweis aktiver Gelatinasen im Mediumüberstand von Chorionkarzinomzellen. Dazu wurden zunächst je 5×10^4 Zellen in eine 24-Lochplatte ausgesät. Nachdem die Zellen angewachsen waren, wurden sie mit 500 µl serumfreien Medium überschichtet und weitere 24 h inkubiert. Nach Zusatz von rNOV (500 ng/ml) wurden die Zellen für Zeitintervalle von 30 min bis 48 weiter inkubiert und danach das Medium entnommen. Es folgte eine SDS-Gelelektrophorese mit einem 0,75 mm dicken Gel wie in 2.2.16 beschrieben mit folgenden Änderungen: das Trenngel enthielt zusätzlich 0.1 mg/ml Gelatin als Substrat für die Gelatinasen und die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei kontinuierlichen 160 V für 1 h. Das Gel wurde anschließend 1 h in einer 2,5%igen Triton-X100 Lösung gespült, wobei diese mindestens viermal gewechselt wurde, und über Nacht bei 37°C in Entwicklungspuffer inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die abschließende Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue zur Visualisierung der Gelatinase-Aktivitäten. Durch das Vorhandensein von Gelatin im Gel, waren diese komplett blau gefärbt und die Spuren der aktiven Gelatinasen wurden durch weiße Banden auf blauem Hintergrund sichtbar. Die Gele wurden zur Dokumentation des Versuches eingescannt.

Entwicklungspuffer: 5 mM CaCl_2 ; 50 mM Tris pH 8,8; 0,02% NaN_3

Coomassie-Färbelösung: Methanol:Essigsäure:Aqua dest. (4,5:1:4,5, v:v:v); 0.1% (w/v) Coomassie brilliant blue R-250

Coomassie-Entfärbe-/Fixierlösung: Methanol:Essigsäure:Aqua dest. (4,5:1:4,5, v:v:v)

2.2.19 Endoglykosidase-Behandlung

Die N-Glykosylierung des NOV Proteins wurde durch die Behandlung mit zwei verschiedenen Endoglykosidasen nachgewiesen, mit denen sich die drei Hauptformen von Oligosaccharidketten an Glykoproteinen unterscheiden lassen. Neben der Positivkontrolle mit rekombinanter RNase B, bei der beide Endoglykosidasen wirksam sind, wurden folgende Proteinproben zur Analyse eingesetzt: Zelllysate aus Chorionkarzinomzellen (50 µg), methanolgefällte Proteine aus konditioniertem Medium (50 µg), Plazentagewebe (50 µg), Serum (10 µg), entsalzte und ankonzentrierte Urinproben (50 µg) und rekombinantes NOV aus murinen Melanomzellen (100 ng). Die Deglykosylierung erfolgte in jeweils zwei 10-20 µl Ansätzen. Dazu wurden die Proben zunächst mit 1-2 µl Denaturierungspuffer versetzt und 10 min bei 95°C gekocht. Nach Abkühlen der Proben auf Eis wurden die Endoglykosidasen (Endo Hf 2000 Units, PNGase F 1000 Units) und 2 µl des entsprechenden Puffers zugegeben, sowie jeweils 2 µl Nonidet-P40. Es folgte eine ein- bis zweistündige Inkubation der Proben bei 37°C. Die Kontrollproben wurden ohne Zusatz von Endoglykosidasen der gleichen Prozedur unterzogen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels Western Blot (2.2.17).

2.2.20 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Zur Quantifizierung der ADAM-12S Konzentration in Zellkulturüberständen von Jeg3 Zellen wurden die Zellen 24-48 h inkubiert und anschließend in Zusammenarbeit mit Jens Rasch (MTA) im wissenschaftlichen Labor der Abteilung für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Essen analysiert. Die Durchführung der ELISAs erfolgte dabei gemäß Herstellerangaben (DRG Diagnostics, Marburg).

Die Quantifizierung von NOV in Serum und Urin erfolgte in Zusammenarbeit mit mehreren Kooperationspartnern: die Abteilung für Frauenheilkunde des Universitätsklinikums Essen (Prof. M. Schmidt) war zuständig für die Akquirierung der Patientinnen und die Etablierung einer Biobank mit Urin- und Serumproben sowie Plazentagewebe (B. Beckhoff, Arzthelferin; J. Rasch, MTA). Die Entwicklung und Validierung des NOV-ELISA wurde von der Firma DRG Instruments GmbH (Dr. A. Janetzko, Dr. M. Herkert) durchgeführt. In Zusammenarbeit mit der Universität Würzburg (Prof. N. Schütze; Orthopädisches Zentrum für Muskuloskelettale Forschung) wurde rekombinantes NOV für die Etablierung des ELISA hergestellt.

Außerdem wurden verschiedene NOV-Antikörper für die Verwendung im ELISA auf ihre Spezifität mittels Western Blot getestet. Das Zentrum für klinische Studien Essen (ZKSE)/Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie (IMIBE) des Universitätsklinikums Essen (Prof. K.-H. Jöckel; Dr. A. Scherag) war zuständig für die statistische Auswertung der ELISA Daten. Für die Analyse von NOV über den Schwangerschaftsverlauf wurden Einzelverläufe der Messwerte für jede Indikationsgruppe über die Tage der Schwangerschaftswochen (SSW) abgebildet. Für die Kontrollgruppen wurden Bereiche des empirischen 5., 25., 75., 95. Perzentils des Querschnitts für die SSW 11 bis 40 dargestellt. Für die Inferenzstatistik kamen gemischte lineare Modelle zur Anwendung (feste Effekte: Indikationsgruppe (gegen Kontrolle), Zeit (Tag der SSW; linear); zufällige Faktoren: Probandin („random intercepts“)).

2.2.21 Isolierung von RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zelllysaten erfolgte mit Hilfe des „Total RNA Kit“ (E.Z.N.A). Dazu wurden die Zellen einer 35 mm-Schale mit einem sterilen Zellschaber abgelöst in Lyse-Puffer aufgenommen und die Suspension mit einer 23G-Kanüle resuspendiert, um die Zellen vollständig aufzuschließen. Die weitere Isolierung und Aufreinigung der RNA erfolgte gemäß Herstellerangaben. Bevor die Proben bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C eingefroren wurden, wurde deren RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

2.2.22 Reverse Transkription

Vor der reversen Transkription (RT) wurden die RNA-Proben zunächst von Verunreinigungen durch genomische DNA befreit. Dazu wurden jeweils 2 µg der isolierten RNA mit 1U DNase I und 2 µl DNase-Puffer versetzt und mit DEPC-Wasser auf ein Volumen von 20 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die DNase I durch eine zehnminütige Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert und die Proben auf 8 °C abgekühlt. Anschließend erfolgte die reverse Transkription für 1 h bei 37 °C mittels der MMLV reversen Transkriptase:

RT-Ansatz:

10 µl	5 x RT Puffer
2,5 µl	dNTP Mix
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	Oligo(dT) ₁₈ Primer (0,5 µg/µl)
1 µl	MMLV-RT (200 U/µl)
12,5 µl	DEPC-H ₂ O

Im Anschluß an die RT-Reaktion wurde das Enzym durch fünfminütiges Kochen der Proben bei 95 °C inaktiviert. Die entstandene cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.23 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die semiquantitative PCR wurde genutzt, um Primer (siehe Tabelle 3) auf ihre Spezifität zu prüfen und um cDNA-Standardreihen für die quantitative real-time PCR herzustellen. Damit konnten die Expression der untersuchten Gene quantifiziert werden. Das folgende Pipettierschema und Syntheseprogramm wurde für die in Tabelle 3 aufgeführten Gene verwendet:

Pipettierschema:

4 µl	cDNA
5 µl	10 x PCR-Puffer
1,5 µl	dNTP Mix
1 µl	forward Primer (25 pmol/µl)
1 µl	reverse Primer (25 pmol/µl)
0,5 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
37 µl	HPLC-H ₂ O

Syntheseprogramm:

94 °C	2 min	} 35 Zyklen	1 Zyklus
94 °C	45 s		
60 °C	45 s		
72 °C	2 min		
72 °C	5 min		1 Zyklus

Nach abgeschlossener PCR wurden die Proben wie in 2.2.23 beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt und das Amplifikationsprodukt aus dem Gel isoliert (siehe 2.2.24).

2.2.24 DNA-Gelelektrophorese

Die cDNA-Proben wurden zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt und dann auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen. Um die DNA anzufärben, wurde das Gel vor dem

Aushärten mit Ethidiumbromid (0,5 mg/ml) versetzt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V für ca. 1 h. Als Größenstandard diente die „Gene Ruler 100 bp DNA Ladder plus“. Die Dokumentation der Elektrophorese erfolgte unter UV Licht an einer Geldokumentationsanlage.

TBE-Puffer (pH 8,2): 90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 2 mM EDTA

2 % Agarosegel: 2% (w/v) Agarose; 0,005% (v/v) EtBr; ad. 1 x TBE-Puffer

10 x DNA-Ladepuffer: 50% (v/v) Glycerin; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 75 mM EDTA

2.2.25 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des „MinElute Gel Extraction Kit“ (E.Z.N.A) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Die Lagerung der DNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.26 Quantitative real-time PCR

Das für die quantitative real-time PCR verwendeten Pipettierschema, sowie das PCR-Syntheseprogramm sind weiter unten angegeben. Die benutzten Primer sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Nach jeder reversen Transkription wurde in der neu synthetisierten cDNA zunächst der Gehalt des Haushaltsgens β -Aktin gemessen, gegen den alle weiteren untersuchten Gene dieser Probe abgeglichen wurde. Die PCR Reaktion wurde jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand der Schmelzkurve analysiert und die quantitative Bestimmung der jeweiligen Expressionswerte eines Gens in einer cDNA-Probe erfolgte anhand der Standardreihen. Die Standardreihen wurden mit Konzentrationen von 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg und 0,1 fg des entsprechenden Gens ebenfalls in Triplikaten in die gleiche 96-Lochplatte pipettiert wie die zu untersuchenden Proben.

Pipettierschema:

10 μ l	Power SYBR Green PCR Master Mix
0,15 μ l	sense Primer (25 pmol/ μ l)
0,15 μ l	antisense Primer (25 pmol/ μ l)
8,7 μ l	DEPC H ₂ O
1 μ l	cDNA Reaktionsansatz

Syntheseprogramm:

50 °C	120 s	1 Zyklus	
95 °C	600 s	Aktivierung der AmphTaqGold® Polymerase	
95 °C	15 s	Denaturierung	} 45 Zyklen
60 °C	60 s	Annealing und Elongation	
95 °C	15 s	Denaturierung	
60 °C	30 s	Annealing	
95 °C	15 s	DNA-Stränge aufschmelzen, gleichzeitige Fluoreszenzmessung	

2.2.27 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Experimenten erfolgte mit Hilfe des Statistik-Programms SPSS 16.0 (mit Ausnahme des NOV-ELISAs, siehe Abschnitt 2.2.20). Es wurde ein Mann-Whitney-Wilcoxon Test für nichtparametrische unabhängige 2-Gruppen Vergleiche durchgeführt, wobei das Quantil mit einem Wert von $p = 0,05$ festgelegt wurde, was einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % entspricht. Unterschiede mit einem Wert von $p \leq 0,05$ wurden somit als statistisch signifikant angesehen. In den entsprechenden Abbildungen sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Expression des matrizzellulären CCN-Proteins NOV (CCN3) in der humanen Trophoblastzelllinie Jeg3, im Plazentagewebe, Blutserum und Urin von Präeklampsiepatientinnen

3.1.1 Überexpression von NOV in der humanen Trophoblastzelllinie Jeg3

Um den Einfluss des CCN-Proteins NOV (CCN3) auf die Proliferation, Migration und Invasion von Trophoblastzellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die humane maligne Trophoblastzelllinie Jeg3 verwendet, die durch stabile Transfektion mit NOV eine deutliche Hochregulation auf mRNA- und Protein-Ebene, sowie eine vermehrte Sekretion des Proteins aufweist (Abb. 3.1 Jeg3/NOV-#3 und Jeg3/NOV-#30 im Vergleich zu parentalen Jeg3 und der Vektorkontrolle).

Wie in Abbildung 3.1B gezeigt, lag der NOV-Gehalt der parentalen Jeg3 Zellen unterhalb der Detektionsgrenze des Western Blots (diese liegt bei etwa 1 ng Protein). Daher wurde die Menge an NOV Protein in Jeg3 Zellen zusätzlich mittels eines ELISA gemessen, um die endogene NOV-Expression nachzuweisen. Dabei ergab sich ein intrazellulärer NOV-Gehalt von ca. 5 pg/ml. Das sekretierte NOV im Zellüberstand war mittels ELISA nicht messbar.

Die verwendeten Jeg3/NOV Zellklone wiesen sowohl auf mRNA- wie auch auf Protein-Ebene eine deutliche Überexpression von NOV auf, wobei die immunzytochemische Analyse ein diffuses Expressionsmuster im Cytoplasma, sowie teilweise eine verstärkte Lokalisation von NOV an der Zellmembran in Jeg3/NOV Zellen zeigte (Abb. 3.1C). Das Laufverhalten des Proteins im SDS-Gel zeigte dabei eindeutige Unterschiede zwischen Zelllysate und Mediumüberständen. Die intrazelluläre Form von NOV hatte eine Größe von ca. 48 kDa, wohingegen die sezernierte Form des Proteins eine Bande bei etwa 55 kDa aufwies (Abb. 3.1B).

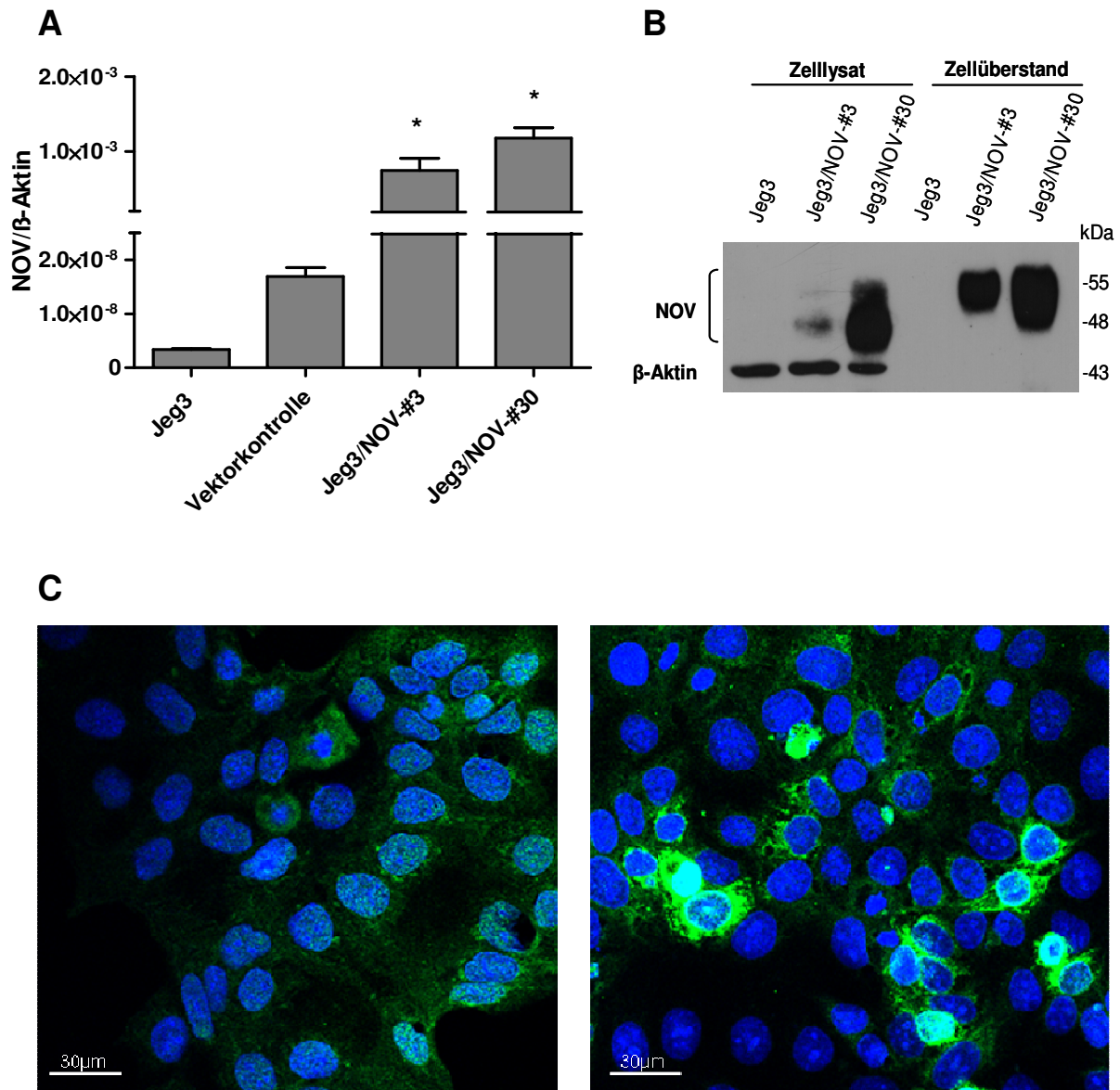


Abb. 3.1: Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen

(A) Quantifizierung der NOV-mRNA Expression in Jeg3 Zellen relativ zu β-Aktin mittels qRT-PCR; n=3, *, p≤0,05 (B) Protein-Expression von intrazellulärem 48 kDa NOV (links) und sezerniertem 55 kDa NOV in aufkonzentrierten Zellüberständen (rechts) mittels Western Blot. (C) Immunzytochemische Analyse der NOV-Lokalisation in parentalen Jeg3 (links) und in Jeg3/NOV Zellen (rechts).

3.1.2 Analyse des Glykosylierungsstatus von NOV in Jeg3 Zellen

Da das NOV-Protein in seiner Sequenz zwei potentielle N-Glykosylierungsstellen aufweist (Chevalier et al., 1998), sollte mit Hilfe eines Endoglykosidase-Verdau analysiert werden, ob die Größenunterschiede zwischen intrazellulärem (48 kDa) und sezerniertem NOV (55 kDa) durch eine N-Glykosylierung entstanden sind. N-glykosylierte Proteine werden je nach Zusammensetzung der vorhandenen

Oligosaccharidketten in drei Haupttypen unterteilt: mannosereich, komplex und hybrid. Durch die Verwendung von zwei Endoglykosidasen mit unterschiedlicher Spezifität konnte die potentielle N-glykosidische Bindung von NOV näher charakterisiert werden. Während die Endoglykosidase PNGase F alle drei Formen von Kohlenhydratketten schneidet, ist Endo Hf spezifisch für mannosereiche und hybrid-Kohlenhydratketten (Maley et al., 1989).

In Abbildung 3.2 sind die Ergebnisse des Endoglykosidase-Verdau dargestellt. Es wurden von jeder Probe jeweils ein Ansatz mit Endo Hf, ein Ansatz mit PNGase F und ein Kontrollansatz ohne die Zugabe von Enzymen im Western Blot analysiert. Die sezernierte 55 kDa-Form von NOV wies nach dem Verdau mit PNGase F ein geringeres Molekulargewicht auf, wohingegen die Kontrollprobe und die mit Endo Hf verdaute Probe keine Veränderungen zeigten. Im Gegensatz dazu waren bei der intrazellulären 48 kDa NOV-Form nach dem Endoglykosidase-Verdau keine Unterschiede im Molekulargewicht zu erkennen (Abb. 3.2A und B).

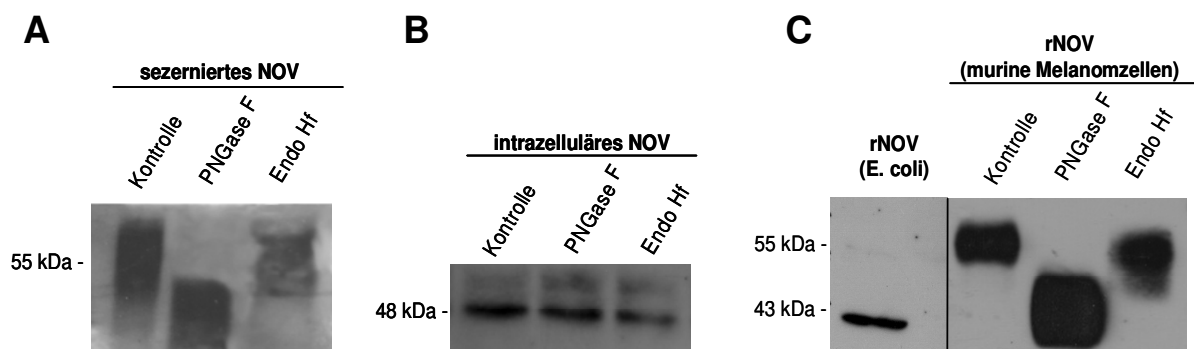


Abb. 3.2: N-Glykosylierungsstatus der verschiedenen Formen des NOV-Proteins

Western Blot Analyse des Endoglykosidase Verdau. Jeg3/NOV-Proben wurden mit Peptid-Endoglykosidase F (PNGase F) und Endoglykosidase Hf (Endo Hf) verdaut. Die unverdauten Kontrollproben wurden unter Zugabe des Vehikels DMSO der gleichen Prozedur unterzogen (siehe Material und Methoden) **(A)** intrazelluläres 48 kDa-NOV aus Jeg3/NOV Zellen, **(B)** sekretiertes 55 kDa-NOV aus Zellkulturüberständen von Jeg3/NOV Zellen, **(C)** rekombinantes humanes NOV (rNOV) aus murinen Melanomzellen (55 kDa) (rechts) im Vergleich zu unglykosyliertem rNOV aus *E. coli* (37 kDa) (links). Im Gegensatz zum 48 kDa NOV zeigt die 55 kDa-Form ein reduziertes Molekulargewicht nach Verdau mit PNGase F.

Um nachweisen zu können, ob bestimmte Zellprozesse wie Migration und Proliferation von NOV und des weiteren von dessen Glykosylierungsstatus abhängig sind, wurden neben den NOV-überexprimierenden Zellen auch parentale Jeg3 verwendet, die mit rekombinatem NOV behandelt wurden. Dafür wurden rekombinante Proteine eingesetzt, die der unglykosylierten intrazellulären bzw. der

glykosylierten sezernierten Form von NOV, wie man sie beide bei Jeg3/NOV Zellen findet, entsprechen. Abbildung 3.2C zeigt den Größenunterschied der beiden verwendeten rekombinanten Proteine: das in murinen Melanomzellen produzierte rNOV ist 55 kDa groß und konnte durch Verdau mit PNGase F deglykosyliert werden. Der Verdau mit Endo Hf hatte keinen Einfluss auf das Molekulargewicht des Proteins. Das durch heterologe Überexpression in *E. coli* Zellen produzierte rNOV ist ca. 37 kDa groß und aufgrund des prokaryotischen Expressionssystems unglykosyliert.

3.1.3 Glykosylierung von NOV in Plazentagewebe, Blutserum und Urin

Im Rahmen dieser Arbeit wurden einige für die ELISA-Studie verwendeten Patientenproben (siehe Abschnitt 3.1.4) auch im Hinblick auf die Glykosylierung von NOV untersucht. Dabei wurde Serum, Urin und Plazentagewebe aus der Indikationsgruppe early-onset Präeklampsie, also vor der 34. Schwangerschaftswoche, im Vergleich zu Kontrollproben korrespondierender Schwangerschaftswochen von gesunden Schwangeren analysiert. In allen drei Probenarten war ausschließlich die 55 kDa-Form des NOV-Proteins vorhanden (Abb. 3.3). Nach einer Behandlung mit Endoglykosidasen zeigte sich, dass NOV in Plazentagewebe, Serum und Urin in der glykosylierten Form vorliegt. Nach dem Verdau mit PNGase F konnte ein geringeres Molekulargewicht nachgewiesen werden, nicht aber nach Verdau mit Endo Hf.

Der Vergleich des Glykosylierungsmusters von NOV in Serum und Plazentagewebe zeigte keinen Unterschied zwischen präeklampsischen Proben und Kontrollproben (Abb. 3.3A).

Die Urinproben mussten entsalzt und aufkonzentriert werden, um genügend Protein für die anschließende Endoglykosidase-Behandlung zu erhalten. Nachdem die Urinproben der Kontrollgruppe auf diese Weise vorbehandelt wurden, war die gewonnene Proteinmenge so gering, dass eine Endoglykosidase-Behandlung nicht mehr durchgeführt werden konnte. Die aus präeklampsischen Urinproben gewonnenen Proteinmengen hingegen waren aufgrund der Proteinurie wie erwartet so hoch, dass die Analyse des Glykosylierungsstatus von NOV durchgeführt werden konnte. Dabei ergab sich das gleiche Muster wie bei der Untersuchung von Serum und Plazentagewebe. Nur nach der Behandlung mit PNGase F, nicht aber mit Endo Hf, war eine Veränderung im Molekulargewicht von NOV zu sehen (Abb. 3.3B).

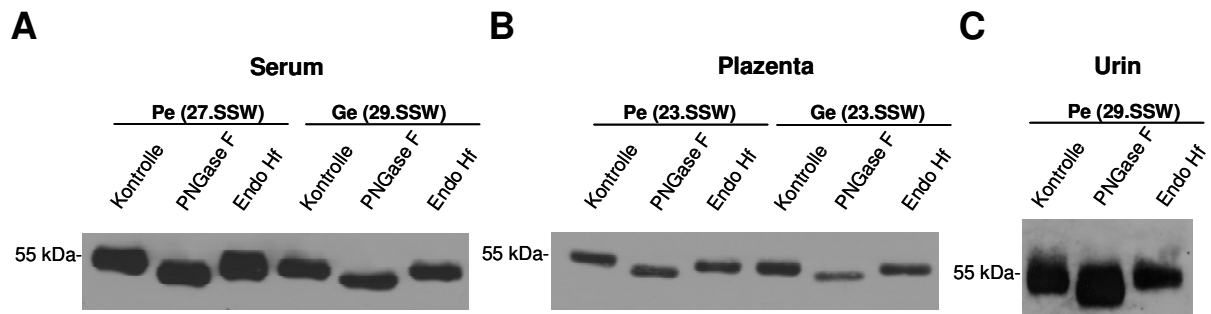


Abb. 3.3: N-Glykosylierungsstatus von NOV in Plazenta, Serum und Urin

Nachweis der N-Glykosylierung von 55 kDa-NOV in Patientenproben. Western Blot des Endoglykosidase-Verdaus mit PNGase F und Endo Hf von **(A)** Serum und Plazentagewebe von gesunden Schwangeren (Ge) und Präeklampsie-Patientinnen (Pe), **(B)** Urinproben von Präeklampsie-Patientinnen (SSW: Schwangerschaftswoche). Beide CCN-Proteine zeigen das gleiche Glykosylierungsmuster in allen Probenarten.

3.1.4 NOV als potentieller molekularer Marker für die Früherkennung von Präeklampsie oder HELLP-Syndrom

Die Grundlage für die Untersuchung von NOV als möglicher prädiktiver Marker für Präeklampsie, IUGR oder HELLP bildeten frühere Studien unserer Arbeitsgruppe, in denen eine Korrelation des NOV-Expressionslevels in Plazentagewebe und Blutserum mit der Diagnose einer early-onset Präeklampsie nachgewiesen wurde (Gellhaus et al., 2006; Gellhaus et al., 2007). Mit Hilfe verschiedener Kooperationspartner wurden eine größere Patientenkohorte akquiriert und ein ELISA für NOV entwickelt um die Quantifizierung und Validierung des CCN-Proteins im Serum und auch im Urin von schwangeren Frauen durchführen zu können (siehe Abschnitt 2.2.20 in Material und Methoden). Die Analyse der Serumproben bei den vier Indikationsgruppen early-onset Präeklampsie (Abb. 3.4A), late-onset Präeklampsie (Abb. 3.4B), intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR; Abb. 3.4C) und HELLP-Syndrom (Abb.3.4C) erfolgte jeweils im Vergleich zu insgesamt 400 Kontrollproben von gesunden Schwangeren. Es zeigten sich hohe intraindividuelle Schwankungen der NOV-Serumwerte bei allen Indikationsgruppen und auch bei den Kontrollgruppen. Die statistische Analyse der late-onset prägeklampischen Patientinnen gab Hinweise auf eine signifikante Erhöhung der NOV-Konzentration im Serum ($n=12$; $p=0,05$) im Vergleich zu den Kontrollen. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der early-onset Präeklampsie ($n=6$; $p=0.17$) und der IUGR-Patientinnen

($n=33$; $p=0,74$) keine statistische signifikanten Unterschiede. Die Gruppe der HELLP-Patientinnen wurde aufgrund der geringen Fallzahl ($n=4$) nicht analysiert.

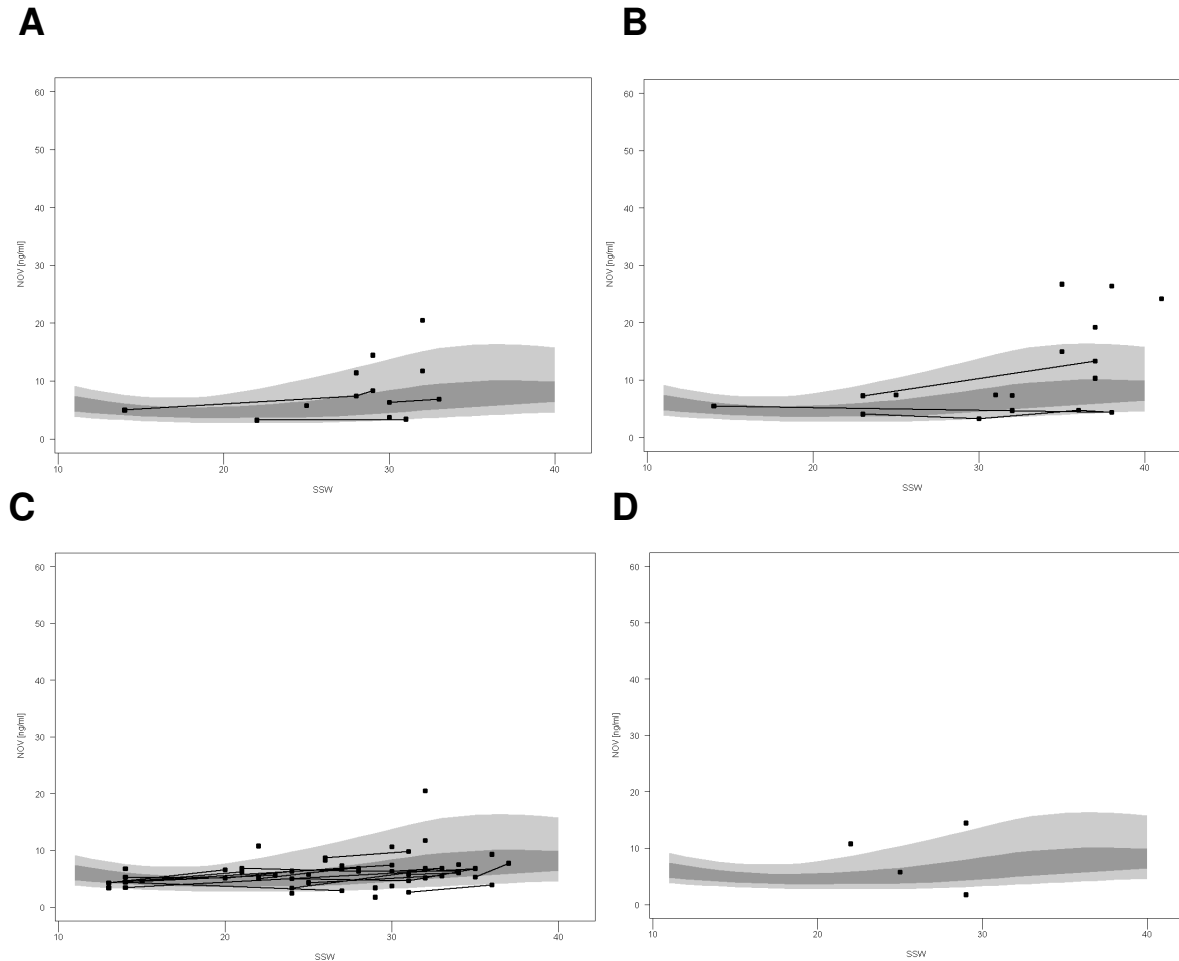


Abb. 3.4: Quantifizierung der NOV-Serumlevel

ELISA-Messungen der NOV-Proteinkonzentration (ng/ml) über den Schwangerschaftsverlauf (SSW); im Hintergrund ist jeweils die empirische Verteilung der Kontrollen ($n=400$) grau dargestellt (dunkelgrau: 25.-75. Perzentil; hellgrau: 5.-95. Perzentil); Fälle und Fallverläufe schwarz. **(A)** Vergleich zu early-onset Präeklampsien ($n=6$), **(B)** Vergleich zu late-onset Präeklampsien ($n=12$), **(C)** Vergleich zu IUGR ($n=33$), **(D)** Vergleich zu HELLP ($n=4$).

Die statistische Analyse der NOV-Konzentrationen in den akquirierten Urinproben ($n=62$) erfolgte nach Normierung gegen den Kreatiningehalt. Die so erhaltenen Werte unterlagen hohen Schwankungen und es zeigten sich bei keiner Indikationsgruppe signifikante Unterschiede zu den Kontrollproben (Daten nicht gezeigt).

3.2 Einfluss von NOV auf Proliferation, Migration und Invasion von Jeg3 Trophoblastzellen

3.2.1 Einfluss von NOV auf das Proliferationsverhalten

Um den Einfluss von NOV auf das Wachstumsverhalten von Trophoblastzellen zu analysieren, wurden zunächst die NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen durch Bestimmung der kumulativen Zellzahl an drei aufeinanderfolgenden Tagen untersucht (Abb. 3.5A). Dabei zeigten die Jeg3/NOV Zellen bereits nach 24 h ein signifikant reduziertes Wachstum im Vergleich zu parentalen Jeg3 Zellen und der Vektorkontrolle. In Abbildung 3.5B ist das Wachstumsverhalten der parentalen Jeg3 Zellen unter dem Einfluss der beiden rekombinanten NOV-Proteine dargestellt. Die Stimulierung mit unglykosyliertem, wie auch mit glykosyliertem rNOV führte nach einer Inkubationszeit von drei Tagen zu einer signifikant reduzierten Proliferation der Jeg3 Zellen.

Als Nächstes wurde untersucht, ob die sezernierte glykosylierte Form von NOV für die Veränderung des Proliferationsverhaltens von Jeg3/NOV Zellen verantwortlich ist. Dazu wurden zwei verschiedene unspezifische Sekretionsinhibitoren ausgetestet, die die Sezernierung von NOV aus der Zelle blockieren: Brefeldin A (BFA) und Monensin (MO). Die Zellen wurden 24 h in Anwesenheit von BFA, MO bzw. dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Anschließend wurden das Zelllysate und die Zellüberstände aufbereitet und im Western Blot analysiert (Abb. 3.5C). Es zeigte sich insbesondere nach Behandlung mit BFA eine deutliche Reduktion von NOV im Zellüberstand bzw. eine Akkumulation des Proteins im Zelllysate von beiden Jeg3/NOV-Zellklonen. Da der Effekt von Monensin auf die Sezernierung von NOV wesentlich geringer war, und eine Verlängerung der Inkubationszeit oder Erhöhung der Konzentration aufgrund der Toxizität der Substanz nicht möglich war, wurde für die nachfolgenden Versuche ausschließlich BFA verwendet.

Wie bereits erwähnt, zeigten die Jeg3/NOV Zellen bereits nach 24 h eine signifikant reduzierte Proliferation (Abb. 3.5A). Dieser antiproliferative Effekt gegenüber den parentalen Jeg3 und der Vektorkontrolle wurde durch die 24 stündige Vorbehandlung mit BFA aufgehoben (Abb. 3.5D). Da zunächst unklar war, ob die inhibierende Wirkung des BFA für die Dauer des Versuches anhielt, wurden die Proben nach der Bestimmung der Zellzahl lysiert und mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.5D rechts). Dabei zeigte sich, dass auch nach insgesamt 48 h eine deutliche Akkumulation von NOV im Zelllysate bzw. eine Abnahme des Proteins im

Zellüberstand zu sehen war. Somit war die inhibierende Wirkung des BFA in diesen Proben bestätigt.

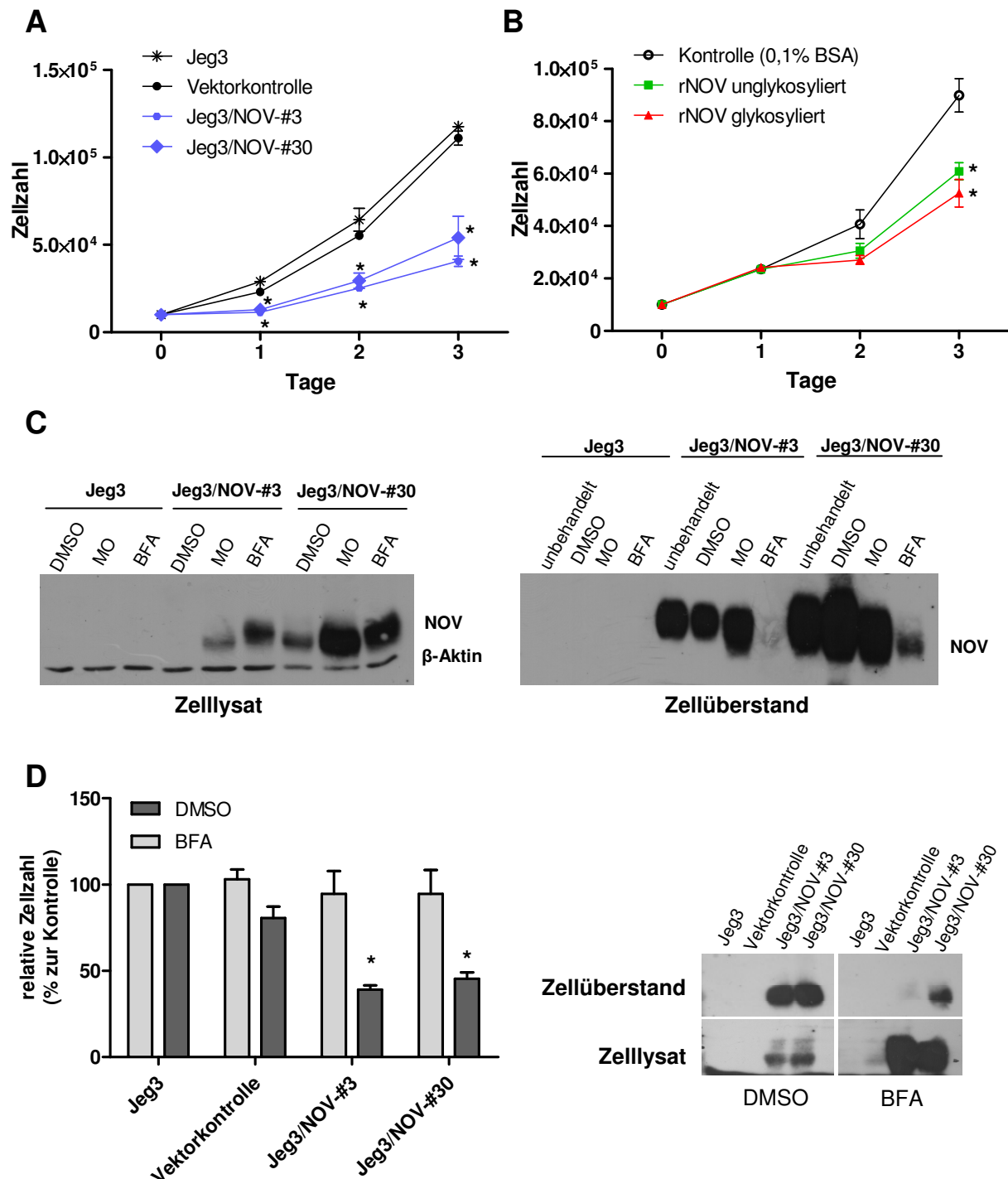


Abb. 3.5: Einfluss von NOV auf das Wachstumsverhalten von Jeg3 Zellen

Proliferationsassay von (A) NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen (Jeg3/NOV) im Vergleich zu parentalen Jeg3 und Vektorkontrolle und (B) parentalen Jeg3 Zellen nach Behandlung mit rNOV ($1 \mu\text{g/ml}$) bzw. 0,1% BSA/PBS (Kontrolle). (C) rechts: Abnahme der NOV-Sezernierung von Jeg3/NOV Zellen nach 24 stündiger Behandlung mit Monensin (MO) und Brefeldin A (BFA) im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Lösungsmittelkontrolle (DMSO) im Zellüberstand; links: Akkumulation von NOV im Zelllysate. (D) links: 24 h-Proliferationsrate von Jeg3/NOV Zellen im Vergleich zu parentalen Jeg3 und Vektorkontrolle nach Vorbehandlung mit BFA bzw. DMSO; rechts: Nachweis der inhibierenden Wirkung von BFA im Vergleich zu DMSO nach insgesamt 48 h. $n=3$; *, $p \leq 0,05$.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Hemmung der Proliferation durch NOV nicht vom Glykosylierungsstatus des Proteins abhängt, sondern eine parakrine Wirkung des sezernierten NOV ist.

3.2.2 Einfluss von NOV auf das Migrations- und Invasionsverhalten

In einer Studie der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen zu einer signifikant erhöhten Migrationsrate führte (Yang und Wagener et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Glykosylierungsstatus von NOV in direktem Zusammenhang mit der physiologischen Funktion des Proteins steht. Dazu wurden Migrationsassays mit parentalen Jeg3 Zellen durchgeführt, die in Anwesenheit von glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV inkubiert wurden. Im Vergleich zu der mit 0,1% BSA/PBS behandelten Kontrolle, führte die Behandlung mit dem unglykosylierten rNOV zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsrate nach 24h (Abb. 3.6A). Die Behandlung mit glykosyliertem rNOV resultierte nicht in einer signifikanten Veränderung des Migrationsverhaltens. Durch die Vorinkubation von Jeg3/NOV Zellen mit dem Inhibitor BFA, der die Sezernierung von NOV verhindert, kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung des Migrationsverhaltens der Zellen (Abb. 3.6C). Die NOV-überexprimierenden Zellklone zeigten im Vergleich zur Vektorkontrolle mit und ohne BFA-Behandlung die gleiche Tendenz zu einer verstärkten Migration, was bedeutet, dass die sezernierte glykosylierte Form des Proteins keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen hatte.

Des Weiteren sollte auch das Invasionsverhalten der mit rNOV behandelten Jeg3 Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Migrationskammern vor ihrem Einsatz mit Matrigel beschichtet. Es zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle weder die Behandlung mit dem glykosylierten noch mit dem unglykosylierten rNOV zu einer Veränderung des Invasionsverhaltens der Zellen führte (Abb. 3.6B).

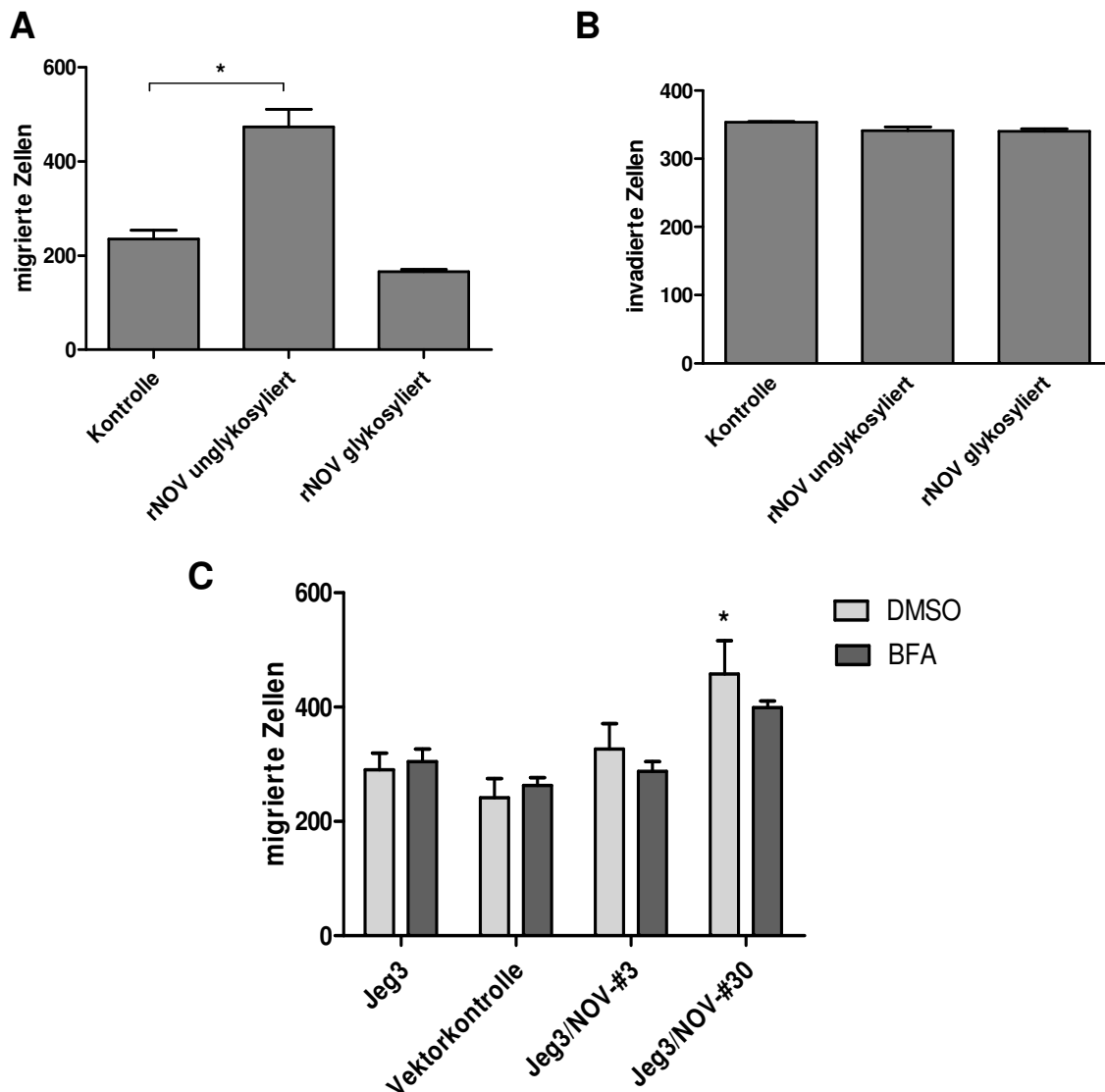


Abb. 3.6: Einfluss von NOV auf das Migrations- und Invasionsverhalten von Jeg3 Zellen

(A) Migration von Jeg3 Zellen nach Behandlung mit rNOV (500 ng/ml) bzw. 0,1% BSA/PBS (Kontrolle), (B) Invasion von Jeg3 Zellen nach Behandlung mit rNOV (500 ng/ml) bzw. 0,1% BSA/PBS, (C) Einfluss von BFA (bzw. DMSO) auf die Migration von Jeg3/NOV Zellen im Vergleich zu parentalen Jeg3 und Vektorkontrolle nach 24. n=3; *, $p \leq 0,05$.

3.2.3 NOV-abhängige Regulierung der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9, sowie ADAM-12

Aus bisherigen Studien der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass die Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen zu einer Aktivierung der beiden für die Trophoblastinvasion essentiellen Matrixmetalloproteasen MMP-2 und -9 führt (Yang und Wagener et al., 2011). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Abhängigkeit der MMP-Aktivierung von den beiden NOV-Formen näher charakterisiert werden. Dazu wurden zunächst parentale Jeg3 Zellen bis zu 8 Stunden in Anwesenheit von rNOV (500 ng/ml) inkubiert und anschließend die Expression von MMP-2 und -9 auf mRNA-Ebene

mittels quantitativer real-time PCR gemessen (Abb. 3.7A). Die Auswertung dieser Daten ergab eine signifikant erhöhte Expression von MMP-2 beginnend nach 30 min Stimulierung mit rNOV, die bis zum Ende des Versuchszeitraums (8 h) anhielt. Dieses Expressionsmuster zeigte sich sowohl nach Inkubation mit unglykosyliertem als auch mit glykosyliertem rNOV, wobei die Hochregulation durch unglykosyliertes rNOV vergleichsweise stärker war. Das Expressionsmuster von MMP-9 wies einige Unterschiede im Vergleich zu MMP-2 auf: nur nach 30 min Stimulierung mit unglykosyliertem rNOV zeigte sich eine signifikante Hochregulation der MMP-9 mRNA, wohingegen das glykosylierte rNOV keine Auswirkung auf die Expression von MMP-9 hatte.

Um neben der Expression auch die Aktivität beider zur Gruppe der Gelatinasen gehörenden MMPs nachweisen zu können, wurden die Zellüberstände von rNOV-behandelten parentalen Jeg3 Zellen gesammelt und mit Hilfe eines Gelatin-Zymogramms analysiert. Dabei wurde der Grad der MMP-Aktivität bzw. die Zu- oder Abnahme der Aktivierung durch rNOV in Relation zur unbehandelten Kontrolle bestimmt (Abb. 3.7B). Es stellte sich heraus, dass trotz der erhöhten MMP-9 mRNA-Expression die Aktivierung dieser Gelatinase so gering war, dass sie nicht auswertbar war. Die Quantifizierung der MMP-2 Aktivität ergab einige Abweichungen im Aktivierungsmuster der beiden unterschiedlichen NOV-Formen. Eine signifikant erhöhte Aktivierung des Enzyms erfolgte nach 30 min, 1 h und 24 h Inkubation mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV. Die Stimulation mit glykosyliertem rNOV führte zusätzlich nach 4 h und nach 48 h zu einer signifikanten Erhöhung der MMP-2 Aktivität.

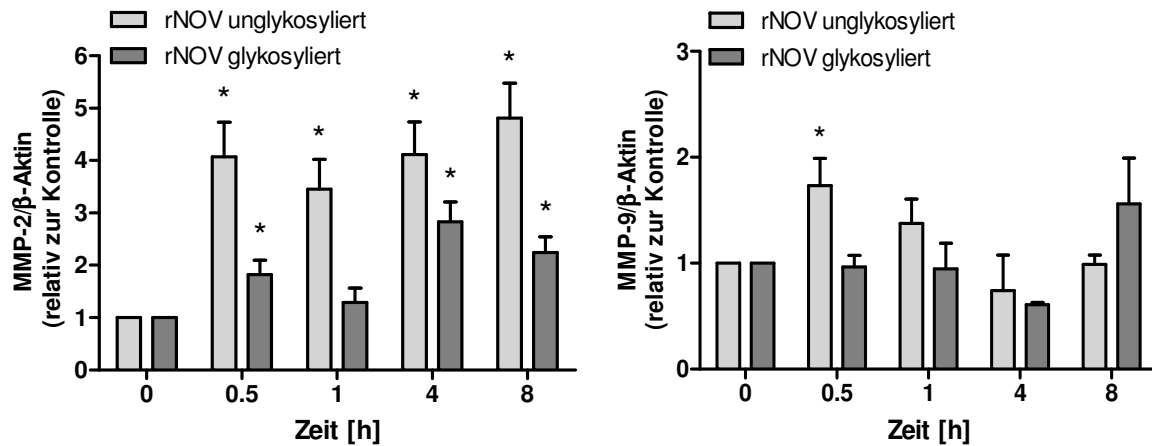
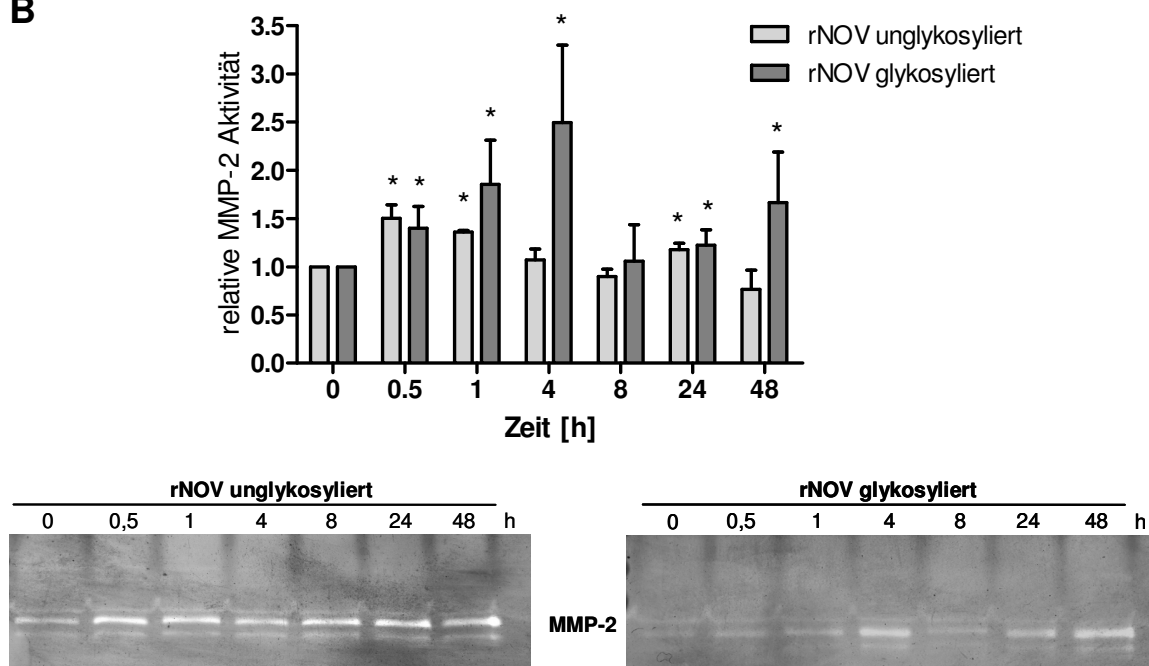
A**B**

Abb. 3.7: Expression und Aktivierung der Matrixmetalloproteasen MMP-2 und MMP-9 in Abhängigkeit von rNOV

(A) Quantifizierung der MMP-2/-9 mRNA Expression relativ zu β-Aktin, Jeg3 Zellen wurden bis zu 8 h mit glykosyliertem (links) bzw. unglykosyliertem rNOV (rechts) inkubiert. (B) Gelatin-Zymographie zur Bestimmung der MMP-2 Aktivität in Überständen von rNOV-behandelten Jeg3 Zellen relativ zur unbehandelten Kontrolle. Dargestellt ist die Quantifizierung von drei unabhängigen Experimenten (oben), sowie ein repräsentatives Zymogramm (unten). n=3, *, p≤0,05.

Neben den beiden untersuchten Matrixmetalloproteasen MMP-2 und -9 wurde auch die Expression der löslichen Form von ADAM-12 (ADAM-12S) im Zellüberstand von Jeg3 Zellen analysiert (Abb. 3.8). Dieses ebenfalls zur Superfamilie der Zink-Proteasen gehörende Enzym besitzt neben der in MMPs vorkommenden Metalloprotease-Domäne eine Disintegrin-Domäne, die für die Bindung an RGD-spezifische Integrine zuständig ist. Die Expression von ADAM-12 wurde nicht nur im

Zusammenhang mit der Trophoblastfusion beschrieben (Huppertz et al. 2006), sondern gilt in Kombination mit PAPP-A1 als biochemischer Marker für Präeklampsie und intrauterine Wachstumsretardierung (Laigaard et al., 2005; Poon et al., 2008).

Der ADAM-12S Gehalt in Jeg3 Zellüberständen wurde mittels ELISA gemessen. Die Ergebnisse zeigten eine tendenzielle wenn auch nicht signifikante Erhöhung von ADAM-12S in Zellüberständen von Jeg3/NOV Zellen (Abb. 3.8A). Die Behandlung parentaler Jeg3 Zellen mit unglykosyliertem rNOV führte zu einer signifikant erhöhten ADAM-12S Sekretion nach 24 h, wohingegen das glykosylierte rNOV keine Auswirkungen auf die Sekretion von ADAM-12S hatte (Abb. 3.8B).

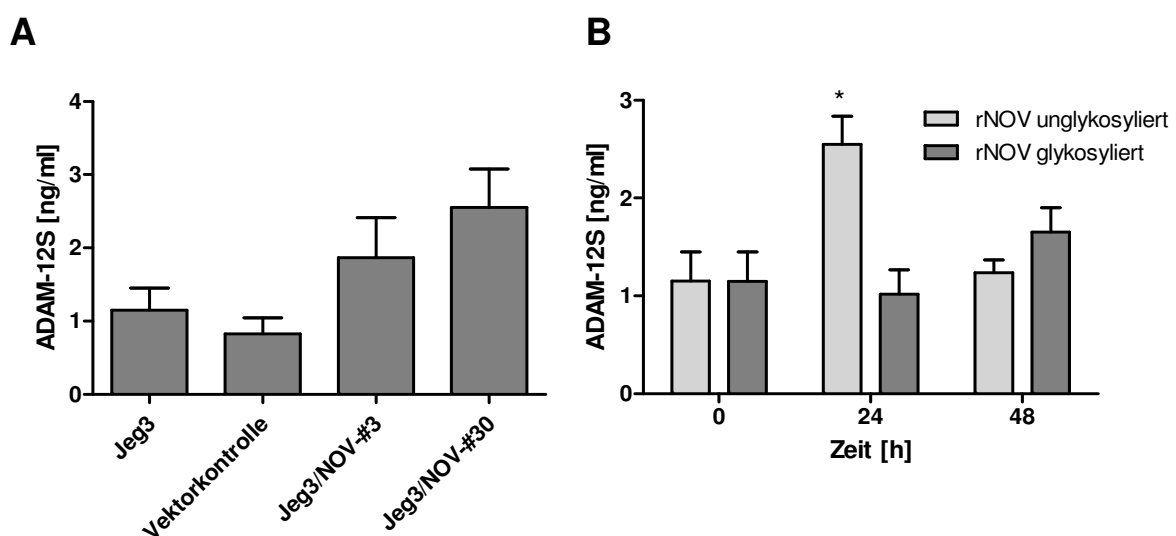


Abb. 3.8: Sezernierung von ADAM-12S in Abhängigkeit von NOV

Quantifizierung des ADAM-12S Gehalts in Jeg3 Zellüberständen mittels ELISA (**A**) Jeg3/NOV Zellen im Vergleich zu parentalen Jeg3 und Vektorkontrolle; (**B**) parentale Jeg3 nach Behandlung mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV (500 ng/ml); n=3; *, $p \leq 0,05$.

3.3 Untersuchung von NOV-abhängigen Signalkaskaden in Jeg3 Zellen

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der durch NOV regulierten Prozesse in Jeg3 Zellen aufzuklären, wurden die Zellen mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV (500 ng/ml) inkubiert und die Aktivierung verschiedener Signalwege untersucht. Zunächst wurde die Expression und Aktivierung von FAK in Jeg3 Zellen untersucht. FAK, eine zytoplasmatische Tyrosin-Kinase, ist eines der signalübertragenden Proteine, das durch seine Aktivierung den dynamischen Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen mitsteuert, ein Prozess der bei der Zellmigration

eine zentrale Rolle spielt. Die Aktivierung von FAK durch Autophosphorylierung an Tyr397 wurde durch einen phosphospezifischen FAK-Antikörper nachgewiesen (pFAK Abb. 3.9). Der Western Blot zeigt, dass die FAK-Phosphorylierung in Jeg3 Zellen unabhängig von der Behandlung mit rNOV stattfand. Im Vergleich zur Kontrolle führte weder das glykosylierte noch das unglykosylierte rNOV zu einer veränderten Aktivierung von FAK.

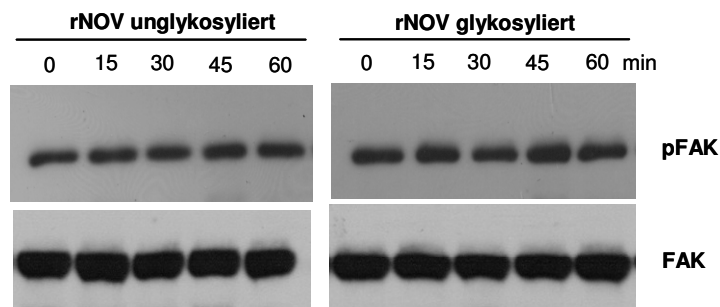
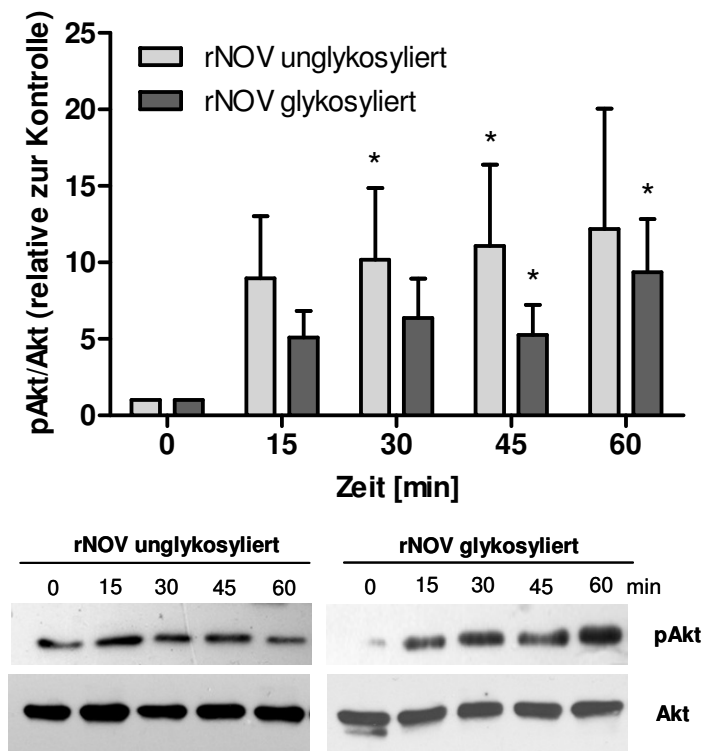
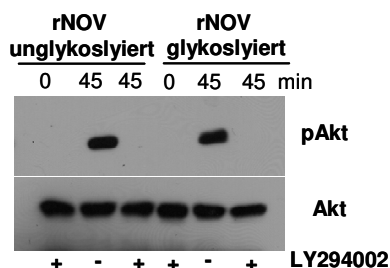


Abb. 3.9: Aktivierung von FAK in Jeg3 Zellen

Konstitutive Aktivierung von FAK unabhängig von der Stimulierung mit glykosyliertem und unglykosyliertem rNOV.

3.3.1 Aktivierung des PI3-Kinase/Akt-Signalweges

Ein wichtiger Signalweg, über den Prozesse wie Migration und insbesondere die Regulation des Zellzyklus in eukaryotischen Zellen gesteuert werden können, ist der PI3-Kinase/Akt-Signalweg. Die Aktivierung von Akt (auch als Proteinkinase B, PKB bezeichnet) erfolgt u.a. über eine Phosphorylierung an Ser473. Für die Analyse der Akt-Aktivierung wurden Antikörper verwendet, die jeweils spezifisch für die unphosphorylierte inaktive Form (Akt) und die phosphorylierte aktive Form von Akt (pAkt) sind. Die in Abbildung 3.10A dargestellte Quantifizierung der Western Blots zeigt, dass es in beiden Versuchsansätzen (glykosyliertes und unglykosyliertes rNOV) zu einer kontinuierlichen Hochregulation von phosphoryliertem Akt kam, wobei das Maximum der Aktivierung durch unglykosyliertes rNOV bei 30-45 min lag, das Maximum durch glykosyliertes rNOV jedoch zeitlich versetzt bei 45-60 min.

A**B****Abb. 3.10: NOV-abhängige Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade in Jeg3 Zellen**

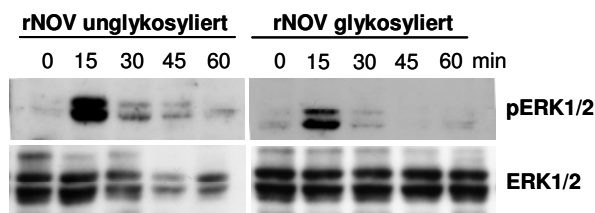
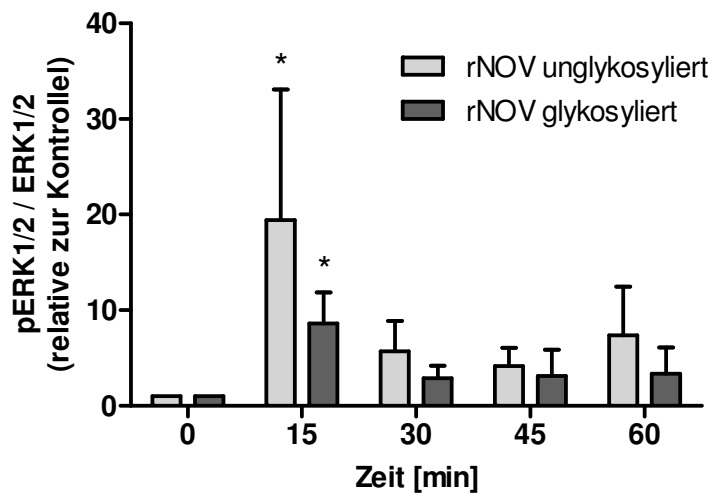
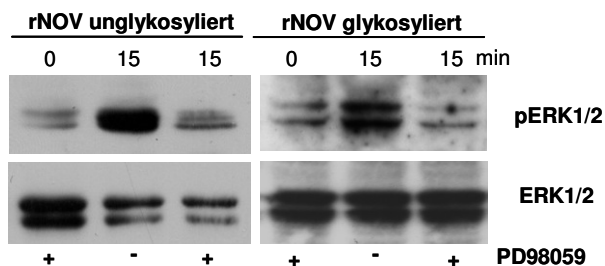
(A) Aktivierung von Akt durch Zugabe von glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV (0-60 min). Unter der densitometrischen Auswertung von pAkt im Verhältnis zu Akt ($n=3$; *, $p \leq 0,05$) ist ein exemplarischer Immunoblot dargestellt, der die Expression der inaktiven Form (Akt) und der durch Phosphorylierung aktivierten Form (pAkt) zeigt. Der Grad der Aktivierung von Akt durch rNOV wurde relativ zur Kontrolle (0 min rNOV) berechnet. Für eine bessere Darstellung wurden alle Werte zu den jeweiligen Kontrollen normalisiert (B) Inhibition der NOV-abhängigen Aktivierung von Akt durch einen PI3K-Inhibitor (LY294002).

Um einen direkten Zusammenhang zwischen der Akt-Aktivierung und NOV nachweisen zu können, wurden Jeg3 Zellen mit einem zellpermeablen PI3-Kinase-Inhibitor (LY294002) behandelt. Die PI3-Kinase wird durch extrazelluläre Stimuli aktiviert, was über mehrere Zwischenschritte schließlich zur Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt führt. Durch die Blockierung der PI3-Kinase kommt es zum Zusammenbruch des kompletten PI3K/Akt-Signalweges (Qiang et al., 2004). Nach

einer einstündigen Vorinkubation mit LY294002 bzw. dem Lösungsmittel DMSO wurden die Zellen lysiert (Lösungsmittelkontrolle = 0 min rNOV) oder 45 min mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV behandelt, da es zu diesem Zeitpunkt bei beiden NOV-Formen zu einer signifikanten Hochregulation von pAkt kam (siehe Abb. 3.10A). Die Analyse zeigt, dass im Gegensatz zur Kontrolle in den LY294002-behandelten Zellen nach 45 min Inkubation mit rNOV keine Phosphorylierung von Akt nachweisbar war (Abb. 3.10B).

3.3.2 Aktivierung des MAP-Kinase/ERK-Signalweges

Die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 wurde mit Hilfe eines phosphospezifischen ERK1/2-Antikörpers nachgewiesen. Abbildung 3.11A zeigt, dass es nach einer 15 minütigen Inkubation mit glykosyliertem rNOV wie auch mit unglykosyliertem rNOV zu einer Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK1/2 kam. Um einen direkten Zusammenhang zwischen NOV und der Aktivierung der beiden MAP-Kinasen nachzuweisen, wurden die Zellen vor der rNOV-Behandlung mit dem Mek1-Inhibitor PD98059 inkubiert. Mek1 gehört ebenfalls zur Familie der MAP-Kinasen und ist der Aktivator von ERK1/2. Durch den Einsatz des Inhibitors PD98059, der an die inaktive Form von Mek1 bindet und so deren Aktivierung verhindert, kann ERK1/2 nicht mehr phosphoryliert werden (Crews et al., 1992). Die Zellen wurden 1 h mit PD98059 bzw. dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert und anschließend 15 min mit rNOV bzw. 0,1% BSA/PBS behandelt. Die Analyse der Zelllysate im Western Blot zeigt, dass die Aktivierung von ERK1/2 in den rNOV-behandelten Proben (glykosyliertes und unglykosyliertes rNOV) durch die Vorinkubation mit PD98059, nicht aber mit DMSO, deutlich schwächer war (Abb. 3.11B).

A**B****Abb. 3.11: NOV-abhängige Aktivierung der MAPK/ERK-Signalkaskade**

Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges in Jeg3 Zellen durch unglykosyliertes und glykosyliertes rNOV. **(A)** transiente Aktivierung von ERK1/2 durch Inkubation mit glykosyliertem und unglykosyliertem rNOV (0-60 min), unter der densitometrischen Auswertung von pERK1/2 im Verhältnis zu ERK1/2 ($n=3$; *, $p \leq 0,05$) ist ein exemplarischer Immunoblot dargestellt, der die Expression der inaktiven (ERK1/2) und der aktivierten Form (pERK1/2) zeigt. Der Grad der Aktivierung von ERK1/2 durch rNOV wurde relativ zur Kontrolle (0 min rNOV) berechnet. Für eine bessere Darstellung wurden alle Werte zu den jeweiligen Kontrollen normalisiert **(B)** Inhibition der NOV-abhängigen Aktivierung von ERK1/2 durch einen Mek-Inhibitor (PD98059).

3.3.3 Die Inhibition der durch NOV aktivierten Signalkaskaden verändert das Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen

Wie in Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2 beschrieben, wurden sowohl der PI3K/Akt- als auch der MAPK/ERK-Signalweg direkt durch die glykosylierte und die unglykosylierte Form

von rNOV aktiviert. Unklar blieb dabei jedoch, ob diese beiden Signalkaskaden in Jeg3 Zellen unabhängig voneinander durch NOV aktiviert werden, oder ob ein „Crosstalk“ zwischen beiden Wegen besteht. Um dieser Frage nachzugehen, wurde in einem „vice versa“-Experiment untersucht, ob die beiden Inhibitoren (LY294002 und PD98059) auch die Aktivierung des jeweils anderen Signalweg blockieren. So wurden die Zellen mit dem PI3K/AKT-Inhibitor LY294002 vorinkubiert, 15 min mit rNOV behandelt und anschließend im Western Blot auf die Aktivierung von ERK1/2 hin untersucht. Umgekehrt wurde der MAPK/ERK-Inhibitor PD98059 eingesetzt und anschließend die Aktivierung von Akt untersucht. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 3.12 dargestellt. Man sieht eine Aktivierung von Akt durch glykosyliertes/unglykosyliertes rNOV unabhängig von PD98059 und eine Aktivierung von ERK1/2 durch rNOV unabhängig von LY294002. Es war also weder möglich die Akt-Aktivierung durch Blockade des MAPK/ERK-Signalwegs zu verhindern, noch war es möglich die ERK1/2-Aktivierung durch Blockade des PI3K/Akt-Signalwegs zu verhindern. Das heißt, dass die beiden untersuchten Signalwege unabhängig voneinander durch NOV aktiviert wurden.

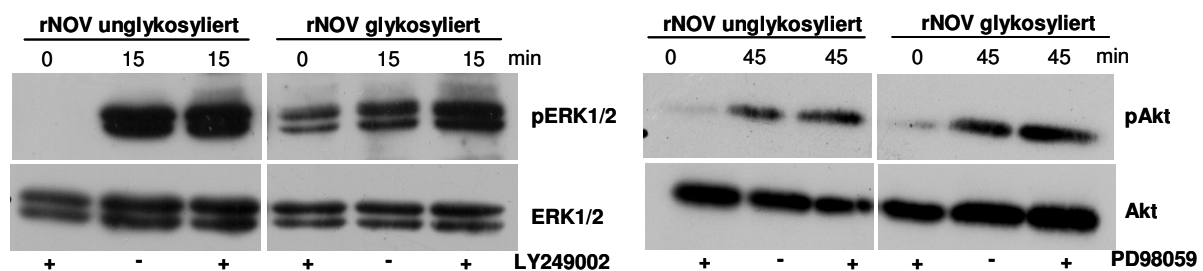


Abb. 3.12: Die NOV-abhängigen Signaltransduktionskaskaden werden unabhängig voneinander aktiviert

links: ERK1/2 Phosphorylierung nach 15 min Inkubation mit glykosyliertem und unglykosyliertem rNOV trotz Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges durch LY294002; rechts: Akt Phosphorylierung nach 45 min Inkubation mit rNOV trotz Inhibition des MAPK/ERK-Signalweges.

Die Blockierung der beiden durch NOV aktivierten unabhängigen Signalkaskaden durch spezifische Inhibitoren wirkte sich auf das Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen aus. Wie in Abbildung 3.13 dargestellt, wurde die migrationsfördernde Wirkung des unglykosylierten rNOV durch Inhibition der Akt-Aktivierung wie auch der ERK1/2-Aktivierung aufgehoben. Bei den mit glykosyliertem rNOV inkubierten Zellen hatte die Behandlung mit den beiden verwendeten Inhibitoren keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten.

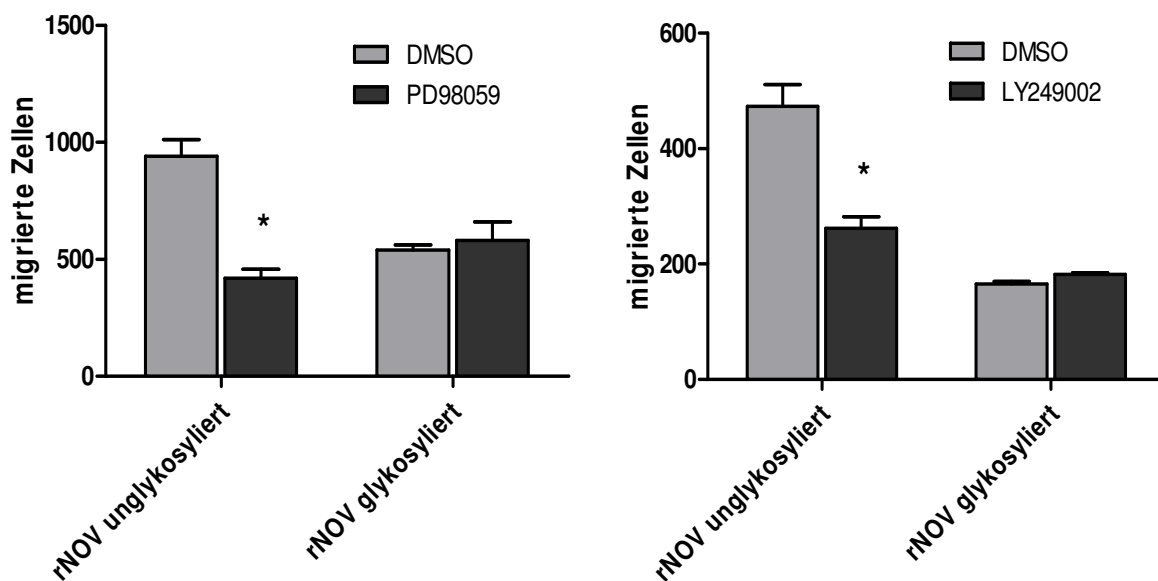


Abb. 3.13: Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen nach Blockade der durch NOV aktivierten Signalkaskaden

Migrationsverhalten von Jeg3 Zellen in Anwesenheit von rNOV. Die NOV-abhängige Migrationszunahme nach 24h wird durch Inhibition der Signalwege mit Hilfe von PD98059 (links) und LY249002 (rechts) wieder reduziert; n=3; *, p≤0,05.

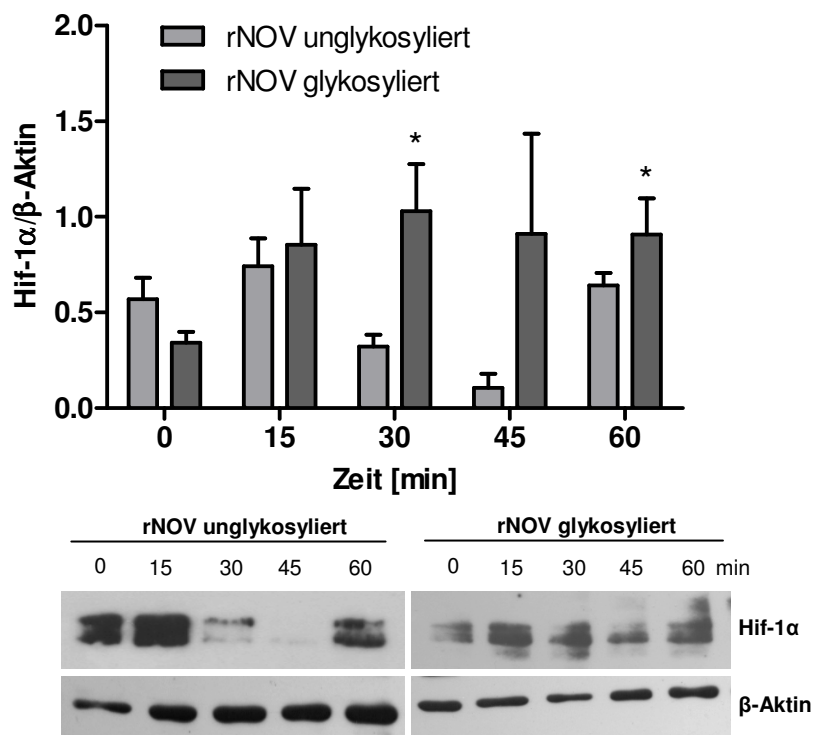
Die Auswirkung der Signal-Blockade auf die proliferationshemmende Wirkung von rNOV (siehe Abb. 3.5B) konnte mit dem gewählten Versuchsansatz nicht untersucht werden, da sowohl die Behandlung mit der glykosylierten Form als auch mit der unglykosylierten Form von NOV erst nach drei Tagen zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von Jeg3 Zellen führte. Es war jedoch nicht möglich, die Zellen über einen längeren Zeitpunkt als 24 h in Anwesenheit der Inhibitoren gegen den PI3K/Akt- und den MAPK/ERK-Signalweg zu inkubieren, da die Blockade beider Signalwege über einen längeren Zeitraum zum vermehrten Zelltod führte.

3.3.4 Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors 1α (Hif-1α) durch glykosyliertes NOV

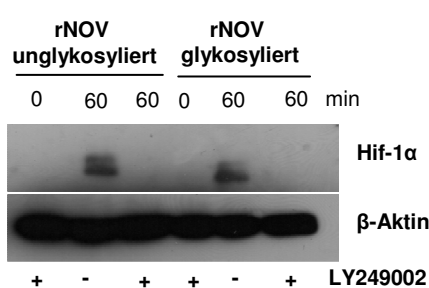
Bei vielen Zellprozessen wie Proliferation, Migration und Invasion spielen auch Hypoxie- bzw. Hif-1α regulierte Faktoren eine Rolle. In einer Studie von Wolf et al. (2010) wurde bereits ein Zusammenhang zwischen NOV und Hif-1α in Jeg3 Zellen unter hypoxischen Bedingungen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die

sauerstoffunabhängige Stabilisierung des Hif-1 α Proteins in rNOV behandelten Jeg3 Zellen untersucht. Es zeigte sich, dass in den Kontrollproben, die nicht mit rNOV, sondern nur mit dem Lösungsmittel 0,1% BSA/PBS behandelt waren, der Gehalt an Hif-1 α zwar stark schwankte, die Behandlung mit glykosyliertem rNOV jedoch nach 30 min zu einer signifikanten Stabilisierung von Hif-1 α führte (Abb. 3.14A). Die Behandlung mit der unglykosylierten Form von rNOV hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Stabilisierung des Hif-1 α Proteins.

A



B



C

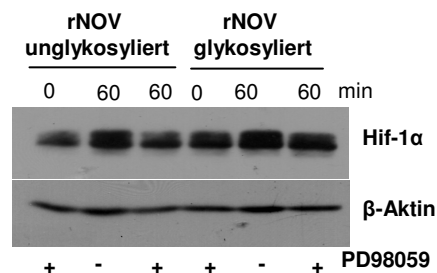


Abb. 3.14: Stabilisierung des Hif-1 α Proteins durch glykosyliertes rNOV in Jeg3 Zellen

(A) Densitometrische Auswertung der Hif-1 α -Expression in Relation zu β -Aktin nach Inkubation mit glykosyliertem und unglykosyliertem rNOV (n=3; *, p \leq 0,05), darunter ist ein exemplarischer Immunoblot dargestellt (B) Hif-1 α Expression nach einstündiger Inkubation mit rNOV bzw. 0,1% BSA/PBS unter dem Einfluss von LY249002 bzw. DMSO; (C) Hif-1 α Expression nach einstündiger Inkubation mit rNOV bzw. 0,1% BSA/PBS unter dem Einfluss von PD98059 bzw. DMSO.

Um herauszufinden, ob Hif-1 α in die durch NOV aktivierten Signalwege involviert ist, wurden Jeg3 Zellen vor der Behandlung mit rNOV mit den bereits erwähnten Inhibitoren vorinkubiert und anschließend die Expression bzw. Stabilisierung von Hif-1 α analysiert. Die Inhibition der durch NOV aktivierten PI3K/Akt-Signalkaskade mit Hilfe des PI3K-Inhibitors LY294002 führte dazu, dass Hif-1 α in diesen Zellen nicht stabilisiert wurde (Abb. 3.14B). Im Gegensatz dazu hatte die Blockade des MAPK/ERK-Signalweges durch den Mek-Inhibitor PD98059 keine Auswirkungen auf die NOV-induzierte Hif-1 α Stabilisierung (Abb. 3.14C).

3.4 Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt NOV-induzierte Zellprozesse

In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass Jeg3 Zellen verschiedene Integrin Untereinheiten wie $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ exprimieren (Zygmunt et al., 1998; Burleigh et al., 2007; Lash et al., 2007; Ma et al., 2009). Es ist ebenfalls bekannt, dass NOV als Ligand für verschiedene Integrine agiert, obwohl es keine typische RGD-Sequenz enthält. So wurde z.B. in Endothelzellen von humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) die Interaktion von NOV mit den Integrinen $\alpha v \beta 3$, $\alpha 6 \beta 1$ und $\alpha 5 \beta 1$ beschrieben (Lin et al., 2005).

3.4.1 Integrin-Expression in Jeg3 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\beta 1$ in Jeg3/NOV Zellen auf Proteinebene untersucht (Abb. 3.15A). Dabei zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Überexpression von NOV und der Expression der genannten Integrin-Untereinheiten. Die Analyse auf mRNA-Ebene mittels quantitativer real-time PCR ließ jedoch eine tendenzielle (Jeg3/NOV-#30) bzw. signifikante (Jeg3/NOV-#3) Hochregulation von Integrin $\alpha 5$ in den untersuchten Jeg3/NOV-Zellklonen erkennen (Abb. 3.15B).

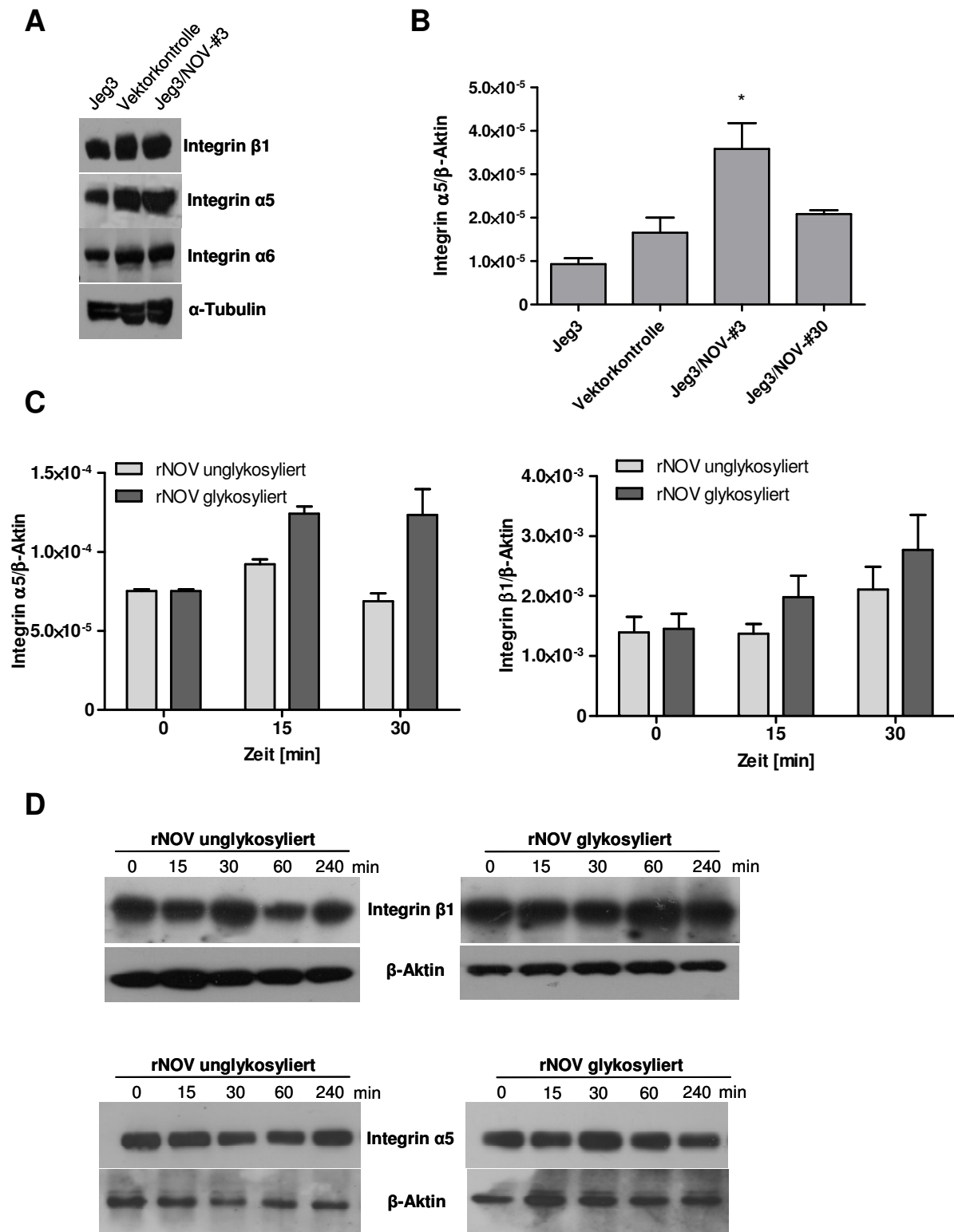


Abb. 3.15: Expression von Integrinen in Jeg3 Zellen

(A) Western Blot Analyse der Expression von Integrin Untereinheiten α5, α6 und β1 relativ zu α-Tubulin in einem NOV-überexprimierenden Jeg3 Klon im Vergleich zu parentalen Jeg3 Zellen und Vektorkontrolle; (B) Quantifizierung der mRNA Expression der Integrin Untereinheit α5 in Jeg3/NOV Zellen im Vergleich zu parentalen Jeg3 Zellen und Vektorkontrolle; (C) Quantifizierung der mRNA Expression der Integrin Untereinheiten α5 (links) und β1 (rechts) relativ zu β-Aktin in NOV-stimulierten Jeg3 Zellen mittels qRT-PCR; (D) Protein-Expression von Integrin α5 und β1 relativ zu β-Aktin in parentalen Jeg3 nach Behandlung mit unglykosyliertem und glykosyliertem rNOV; n=3; *, p≤0,05.

Da die $\alpha 5$ -Untereinheit ausschließlich Dimere mit Integrin $\beta 1$ bildet (Buck und Horwitz, 1987), standen diese beiden Integrin-Untereinheiten bei den nachfolgenden Untersuchungen im Fokus. Bei den parentalen Jeg3 Zellen erfolgte weder eine signifikante Veränderung der Protein-Expression von Integrin $\alpha 5$, noch von Integrin $\beta 1$ nach Behandlung mit rNOV (Abb. 3.15C).

Die immunzytochemische Analyse mit Hilfe eines $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Antikörpers zeigte jedoch eine Lokalisationsänderung des Integrindimers nach einer 30 minütigen Inkubation mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rNOV (Abb. 3.16). Das eher diffus im Zytoplasma verteilte Integrin $\alpha 5\beta 1$ konnte nach Stimulierung mit rNOV verstärkt an der Zellmembran nachgewiesen werden.

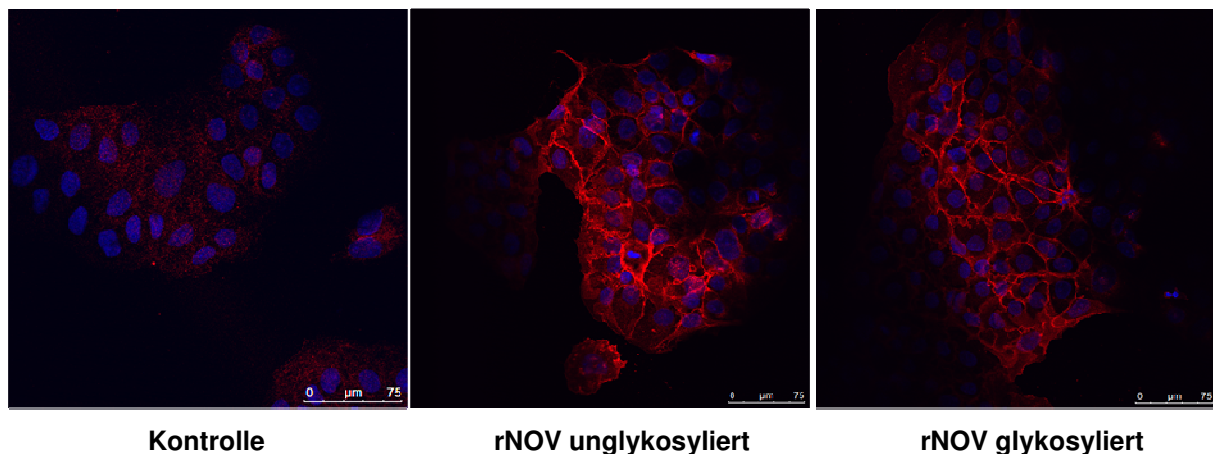


Abb. 3.16: Lokalisationsänderung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ in rNOV-behandelten Jeg3 Zellen
Immunfärbung von Integrin $\alpha 5\beta 1$ (rot). Zellkerne wurden zusätzlich mit DAPI (blau) angefärbt.

3.4.2 Die NOV-induzierte Migration von Jeg3 Zellen wird durch Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt

Wie bereits beschrieben, förderte unglykosyliertes NOV die Migration von Jeg3 Zellen (siehe Abschnitt 3.3.3). Um herauszufinden, ob diese Funktion von NOV tatsächlich über die Bindung an Integrine, im Speziellen über die Bindung an Integrin $\alpha 5\beta 1$ vermittelt wird, wurden die parentalen Jeg3 Zellen zunächst mit einem synthetischen Peptid mit RGD-Sequenz bzw. einem $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Antikörper vorinkubiert, um die mit der Zellmembran assoziierten Integrine zu blockieren. Die Aminosäureabfolge Arg-Gly-Asp (im Einbuchstabencode RGD) ist eine weit verbreitete Erkennungssequenz vieler Proteine der extrazellulären Matrix. Über die Bindung an das RGD-Motiv dieser Proteine können Integrine extrazelluläre Signale

weiterleiten und so verschiedenste Zellprozesse in Gang setzen (Ruoslahti und Pierschbacher, 1987).

Die in Anwesenheit von unglykosyliertem rNOV durchgeführten Migrationsassays zeigten, dass die migrationsfördernde Wirkung von NOV durch die Vorinkubation mit dem $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Antikörper nicht gemindert oder aufgehoben wurde (Abb. 3.17A). Die Vorinkubation der Zellen mit dem synthetischen RGD-Peptid jedoch führte zu einer signifikanten Reduktion der durch unglykosyliertes rNOV erhöhten Migrationsrate. Die Inkubation mit einem Kontrollpeptid ohne RGD-Sequenz hatte keine Auswirkung auf die durch unglykosyliertes rNOV erhöhte Migration (Abb. 3.17B).

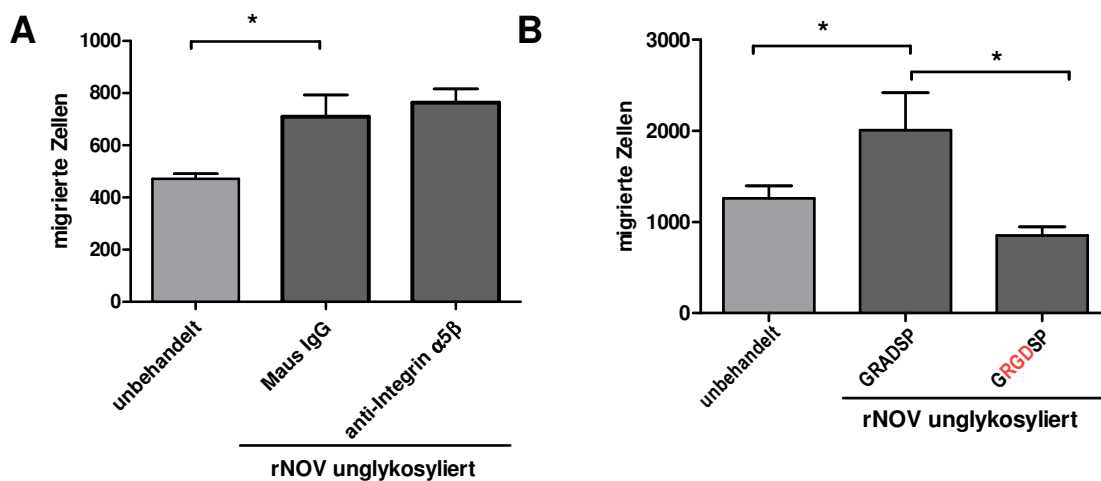


Abb. 3.17: Änderung der NOV-abhängigen Migration von Jeg3 Zellen nach Integrin-Blockierung
Migrationsassays von parental Jeg3 in Anwesenheit von unglykosyliertem rNOV nach (A) Blockierung der membranständigen $\alpha 5\beta 1$ -Integrine mit Hilfe eines Integrin $\alpha 5\beta 1$ -spezifischen Antikörpers. Als Kontrolle diente ein unspezifischer Maus-IgG Antikörper, (B) Blockierung von Integrinen mit RGD-Erkennungssequenz mittels eines synthetischen RGD-Peptids. Als Kontrolle diente ein synthetisches Peptid ohne RGD-Sequenz; n=3; *, p \leq 0,05.

Da sich die Expression von membran-gebundenem Integrin $\alpha 5\beta 1$, wie in Abbildung 3.17 dargestellt, nach Behandlung mit rNOV erhöhte und auch die Blockierung mittels RGD-Peptid zu einer Inhibition der migrationsfördernden Wirkung von unglykosyliertem NOV führte, wurde in einem weiteren Versuchsansatz der direkte Zusammenhang zwischen NOV und Integrin $\alpha 5\beta 1$ mittels siRNA-Transfektion gegen Integrin $\alpha 5$ untersucht. Dafür wurde zunächst die Effizienz des Integrin $\alpha 5$ Knockdowns auf Proteinebene mittels Immunoblot nachgewiesen (Abb. 3.18A). Eine Inkubationszeit von 48 h mit 50 nM Integrin $\alpha 5$ -siRNA stellte sich dabei als optimal heraus, da unter diesen Bedingungen ein spezifischer Knockdown der Integrin $\alpha 5$

Proteine von ca. 80-90% erzielt wurde. Als interne Kontrolle diente dabei eine unspezifische nicht-bindende siRNA (siControl).

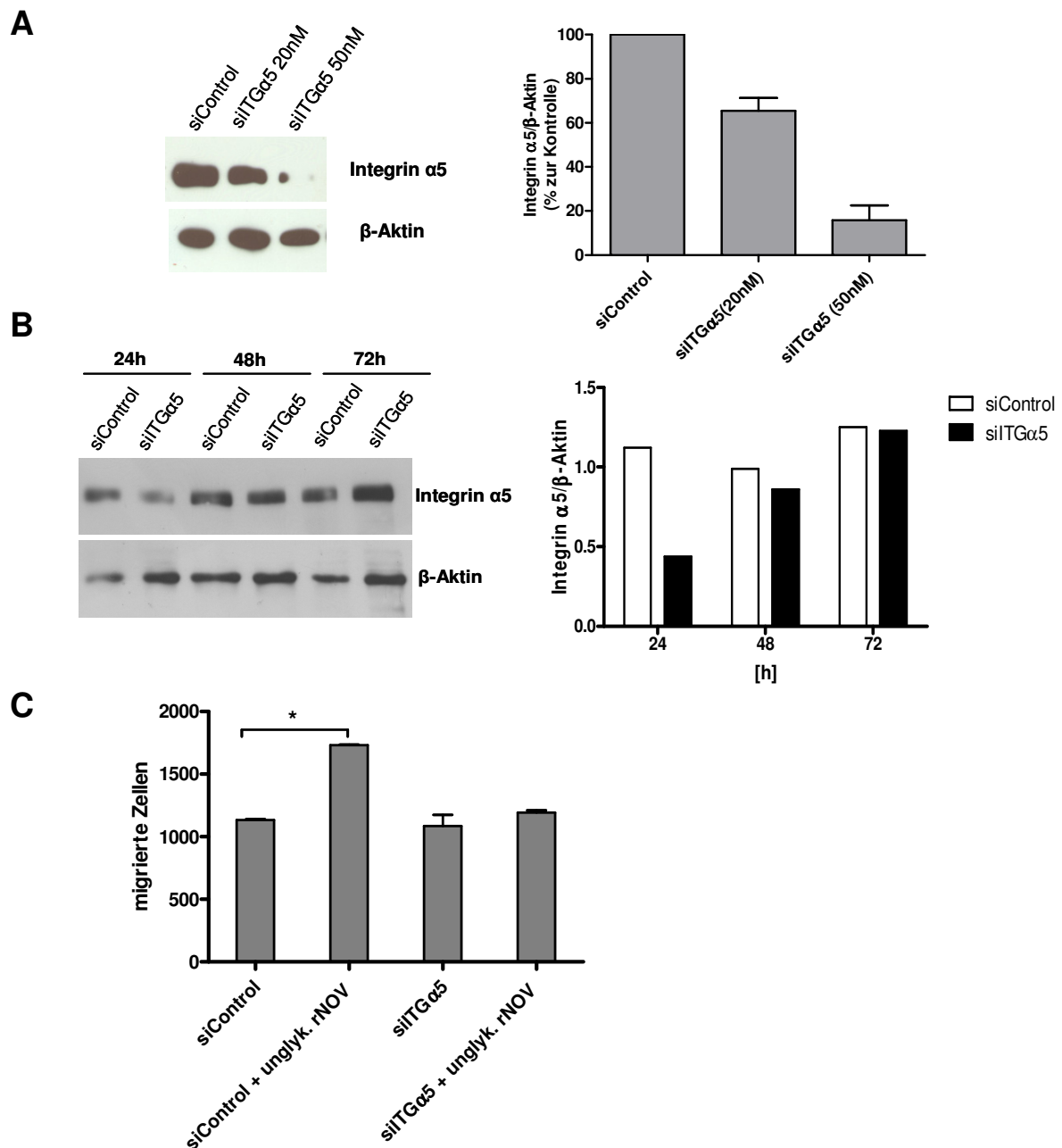


Abb. 3.18: Knockdown von Integrin α5 mittels siRNA und der Einfluss auf die Migration von Jeg3 Zellen

(A) links: exemplarischer Immunoblot der Integrin α5 Protein-Expression. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Integrin α5 siRNA (siTGα5) bzw. mit einer unspezifischen siRNA als Kontrolle (siControl) transfiziert und anschließend 48 h inkubiert; rechts: Quantifizierung des Integrin α5 Knockdowns; die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt; n=3 (B) Nach der 48 stündigen Inkubation mit siRNA wurden die Zellen bis zu 72 h weiterkultiviert, um die Dauer des Knockdown Effekts zu bestimmen. (C) Migrationsassay von Jeg3 nach Integrin α5-Knockdown. Die Zellen wurden mit siTGα5 bzw. siControl transfiziert; nach 48 h wurde das Migrationsverhalten dieser Zellen in An- oder Abwesenheit von unglykosyliertem NOV analysiert; n=3; *, p≤0,05.

Für die nachfolgenden Versuche war es wichtig, die Dauer des Knockdown Effekts zu bestimmen, daher wurden die Zellen 48 h nach der siRNA-Transfektion für weitere 24-72 h inkubiert und anschließend auf ihre Integrin $\alpha 5$ Expression hin analysiert (Abb. 3.18B). Dabei zeigte sich, dass der Knockdown des Integrins nach 24 h noch bei ca. 70% lag, nach 48 h aber bereits wieder fast vollständig aufgehoben war. Bei den nachfolgenden Migrationsassays wurde daher auf die 24stündige Vorinkubation der Zellen mit rNOV verzichtet, um den optimalen Zeitpunkt des siRNA-Effekts auszunutzen. Abbildung 3.18C zeigt trotz der verkürzten Inkubationszeit eine signifikant Migrationszunahme durch unglykosyliertes rNOV, und dass diese Wirkung durch den Knockdown des Integrin $\alpha 5$ Proteins aufgehoben wurde.

3.4.3 Die antiproliferative Wirkung von NOV wird nicht über Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt

Der Einfluss von NOV auf das Wachstumsverhalten von Jeg3 Zellen wurde bereits in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Mit Hilfe des Integrin $\alpha 5$ Knockdowns sollte nun geklärt werden, ob die proliferationshemmende Wirkung von NOV, die sowohl in den NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen als auch in den mit rNOV behandelten parentalen Jeg3 beobachtet wurde, ebenfalls über Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vermittelt wird. Da sowohl das glykosylierte - als auch das unglykosylierte rNOV erst nach 72 h die Proliferation der Jeg3 Zellen signifikant hemmte (siehe Abb. 3.5B), der transiente Knockdown Effekt aber zu diesem Zeitpunkt wieder aufgehoben war (siehe Abb. 3.18B), wurden die Zellen während dieser 72 h ein zweites Mal mit Integrin $\alpha 5$ -siRNA transfiziert, um den Effekt zu verlängern.

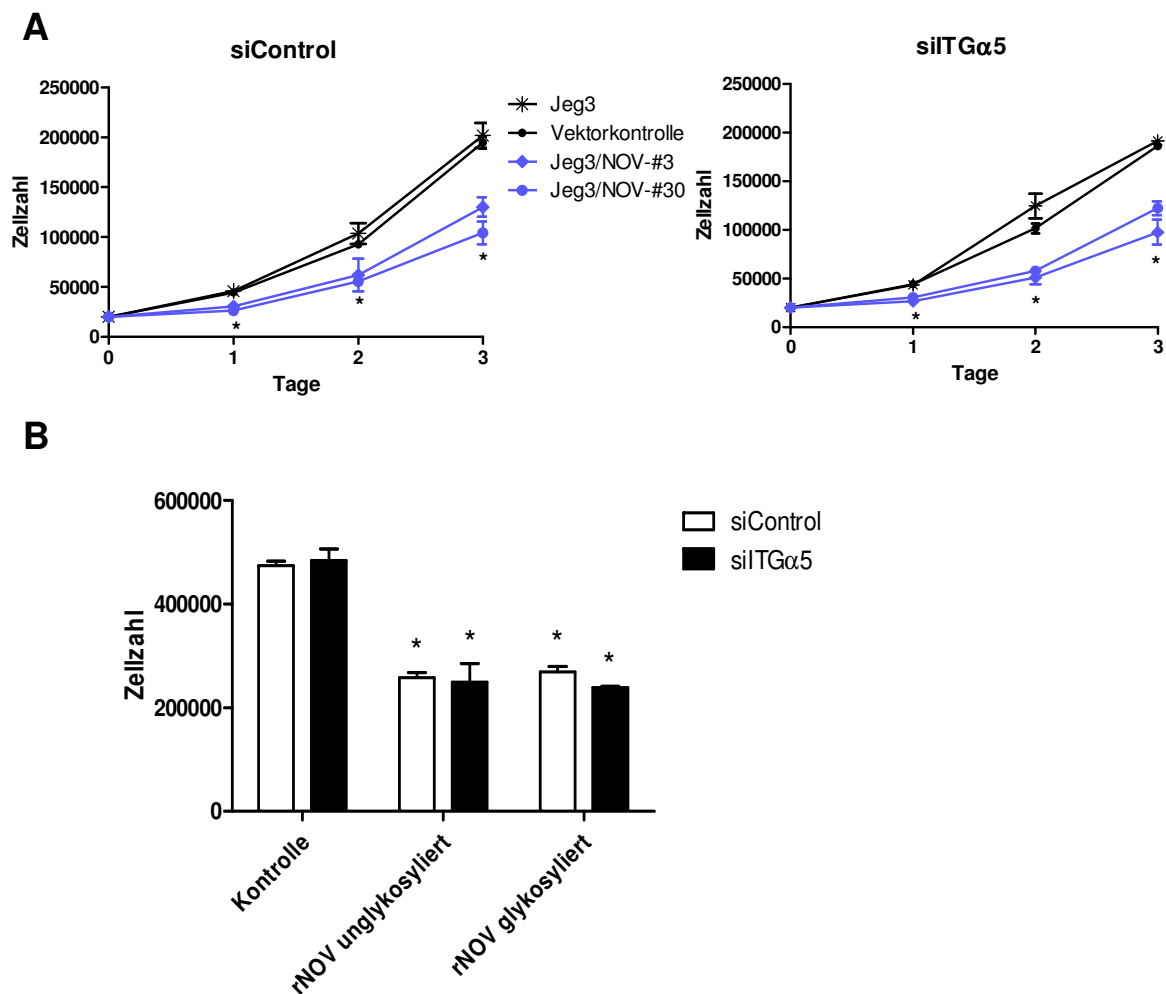


Abb. 3.19: Auswirkungen des Integrin $\alpha 5$ Knockdowns auf das Proliferationsverhalten

Proliferation von Jeg3 Zellen nach Behandlung mit siControl und siITGα5 **(A)** Signifikante Herunterregulation der Proliferation von beiden Jeg3/NOV-Zellklonen im Vergleich zu parentalen Jeg3 und Vektorkontrolle in siControl-behandelten Zellen (links) und siITGα5-behandelten Zellen (rechts); **(B)** signifikant reduzierte Zellzahl nach dreitägiger Inkubation mit rNOV in siControl- und siITGα5-behandelten parentalen Jeg3; n=3; *, p≤0,05.

Das rekombinante NOV wurde während der Dauer des Proliferationsassays täglich frisch zugesetzt. Die Auswertung der Proliferationsrate nach 72 h ergab, dass die siRNA-Behandlung keine Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen hatte (Abb. 3.19A). Die antiproliferative Wirkung beider rNOV-Formen wurde durch den Knockdown von Integrin $\alpha 5$ nicht beeinträchtigt. Auch bei den NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen zeigte der Knockdown von Integrin $\alpha 5$ keine Auswirkungen auf die Proliferationsrate (Abb. 3.19B).

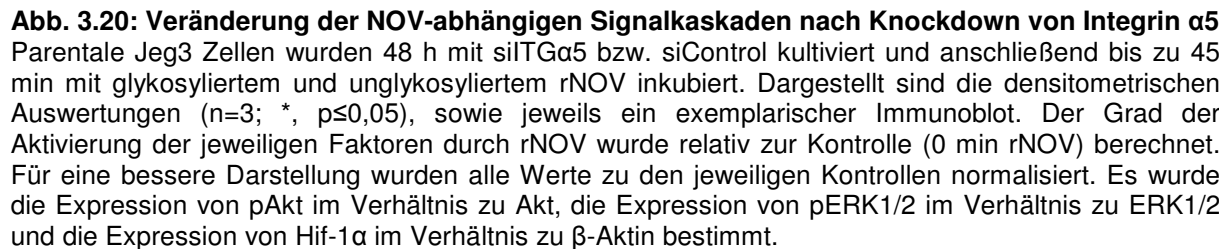
Als weitere Rezeptor-Kandidaten, die die NOV-abhängige Proliferationsreduktion vermitteln könnten, wurden der Notch-Rezeptor (bzw. dessen cytosolische trunkierte Domäne *cleaved Notch*) und die aktivierte Form des EGF-Rezeptors in Abhängigkeit

von NOV mittels Western Blot untersucht. Es ergaben sich jedoch keine Hinweise auf eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch NOV (Daten nicht gezeigt).

3.4.4 Veränderung der durch NOV aktivierten Signalkaskaden nach Knockdown von Integrin $\alpha 5$

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Integrin $\alpha 5\beta 1$ bei der migrationsfördernden Wirkung von NOV eine Rolle spielt. Um die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Signaltransduktion näher zu analysieren, wurde die Integrin $\alpha 5$ Expression zunächst mittels siRNA herunterreguliert, um anschließend die Aktivierung der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Signalkaskaden im Western Blot zu untersuchen (Abb. 3.20). Im Falle des PI3K/Akt-Signalweges erfolgte nach der Herunterregulierung von Integrin $\alpha 5$ zwar eine vermehrte Phosphorylierung von Akt, jedoch zeigte die densitometrische Analyse, dass keine NOV-abhängige Phosphorylierung bzw. Aktivierung von Akt stattfand. Im Gegensatz dazu zeigten die mitgeführten Kontrollen (siControl) wie erwartet nach 30-45 min eine im Falle des unglykosylierten rNOV signifikante, im Falle des glykosylierten rNOV tendenzielle Aktivierung von Akt.

Das Aktivierungsmuster des MAPK/ERK-Signalwegs war durch den Knockdown von Integrin $\alpha 5$ kaum verändert. Beide Formen von rNOV lösten nach 15 min Inkubation eine signifikante Aktivierung dieses Signalweges durch Phosphorylierung von ERK1/2 aus. Im Unterschied zu den siRNA-Kontrollen, führte die Transfektion mit Integrin $\alpha 5$ -siRNA jedoch wie auch bei Akt zu einer allgemein, d.h. unabhängig von NOV vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2, die allerdings weiterhin ihr Maximum nach 15 min Inkubation mit rNOV erreichte.



Die in Abschnitt 3.3.4 beschriebene Stabilisierung von Hif-1 α durch glykosyliertes rNOV (siehe Abb. 3.14A) konnte in den mit siControl transfizierten Zellen nicht nachgewiesen werden. Auch das unglykosylierte rNOV hatte in diesen Zellen keinen Einfluss auf die Hif-1 α -Expression bzw. -Stabilisierung. Durch den Knockdown von Integrin α 5 kam es zwar zu einer deutlich vermehrten Stabilisierung von Hif-1 α , diese war jedoch unabhängig von der Behandlung mit rNOV. Somit konnte der Zusammenhang zwischen NOV und Hif-1 α in diesen Experimenten nicht nachgewiesen werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Herunterregulierung von Integrin α 5 mittels siRNA in Jeg3 Zellen dazu führte, dass eine NOV-abhängige Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges nicht mehr stattfand. Im Gegensatz dazu war die NOV-abhängige Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 durch den Integrin α 5 Knockdown nicht beeinträchtigt.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde das CCN-Protein NOV (CCN3) und seine Rolle in der Migration, Invasion und Proliferation des humanen Trophoblasten untersucht. Als Modell für den frühen proliferativen/invasiven Trophoblasten wurde die Chorionkarzinomzelllinie Jeg3 verwendet. Diese weist neben den charakteristischen Tumormerkmalen Eigenschaften benigner Trophoblastzellen auf und eignet sich daher als Modell sowohl für die Tumorgenese als auch für den Trophoblasten. Ein besonderer Fokus der Untersuchungen lag auf den Signaltransduktionskaskaden, die durch NOV induziert werden und zu Veränderungen in der Zellphysiologie von Trophoblastzellen führen.

NOV wird, wie alle Vertreter der CCN-Proteinfamilie, als „matrizelluläres“ Protein bezeichnet. Dieser Begriff wurde 1995 von Bornstein eingeführt und beschreibt Proteine, die nicht nur rein strukturelle und „organisatorische“ Funktionen der extrazellulären Matrix (EZM) übernehmen, sondern Zell-Matrix- und/oder Zell-Zell-Interaktionen vermitteln und so Prozesse wie Proliferation, Migration, Invasion, Adhäsion und Differenzierung integrativ koordinieren und regulieren (Bornstein, 1995; Bornstein und Sage, 2002).

In früheren Studien der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass NOV - wie auch das zur selben Proteinfamilie gehörende CYR61 (CCN1) - im Verlauf der Schwangerschaft in extravillösen invasiven Trophoblast-Riesenzellen, wie auch in Endothelzellen des embryonalen Gefäßsystems exprimiert wird (Gellhaus et al., 2006). Eine weitere Studie gibt Hinweise auf eine im Vergleich zu gesunden Schwangeren geringere NOV-Konzentration im Blutserum von Patientinnen, die unter einer schwangerschaftsbedingten early-onset Präeklampsie leiden (Gellhaus et al., 2007). Auf der Grundlage der letztgenannten Studie wurde, wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben, eine größere Patientenkohorte mittels ELISA analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass die NOV-Konzentration im Serum von gesunden Schwangeren, wie auch von Präeklampsiepatientinnen, starken interindividuellen Schwankungen unterlag. Im Schwangerschaftsverlauf zeigte sich keine Korrelation zwischen dem Auftreten einer early-onset Präeklampsie und der NOV-Konzentration im Serum. Die signifikante Erhöhung des NOV-Proteins trat nur später im Verlauf der Schwangerschaft bei der Gruppe der late-onset Präeklampsie auf, was NOV als prädiktiven Serum-Marker für die Präeklampsie ungeeignet macht.

Die Expression von NOV in Jeg3 Zellen wurde erstmalig 2004 von Gellhaus et al. beschrieben: die immunzytochemische Analyse in dieser Studie zeigte, dass NOV im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert ist. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde ebenfalls gezeigt, dass die Expression des NOV-Proteins in Jeg3 Zellen einer hypoxischen Regulation unterliegt (Wolf et al., 2010): während es unter normoxischen Bedingungen relativ schwach exprimiert wird, steigt die Expression unter Sauerstoffmangel an. Da also der endogene NOV-Gehalt in normoxisch kultivierten Jeg3 Zellen sehr gering ist, wurden in dieser Arbeit NOV-überexprimierende Jeg3 Zellen verwendet, die einen hohen intrazellulären NOV-Gehalt sowie eine vermehrte Sekretion des Proteins zeigen. Um eine direkte Abhängigkeit bestimmter Zellprozesse wie Proliferation und Migration/Invasion von NOV sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen untersuchen zu können, wurden zudem parentale Jeg3 Zellen mit rekombinantem NOV stimuliert und anschließend analysiert.

4.1 Expression verschiedener Glykosylierungsformen des matrizellulären NOV-Proteins in Jeg3 Trophoblastzellen

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Polypeptid-Sequenz von NOV zwei putative N-Glykosylierungsstellen an den Asparaginresten (Asn)97 und Asn280 aufweist (Chevalier et al., 1998). Eine Studie von Martinerie et al. (2001) zeigt die Expression von N-glykosyliertem NOV in malignen und benignen Tumoren der Nebennierenrinde im Gegensatz zum korrespondierenden Normalgewebe, wo ausschließlich unglykosyliertes NOV nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die N-Glykosylierung von NOV einen Einfluss auf die Funktion des Proteins hat. Die Analyse der intrazellulären und der sezernierten NOV-Form in NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen zeigte, dass es sich um zwei verschiedene N-Glykosylierungsformen des NOV-Proteins handelte. Das sezernierte 55 kDa-NOV wurde als N-glykosyliertes Glykoprotein mit komplexen Kohlenhydratketten identifiziert, wohingegen das intrazelluläre 48 kDa-NOV keine N-Glykosylierung aufwies. In einer kürzlich publizierten Studie wurde mittels der auch in dieser Arbeit verwendeten Kombination an Endoglykosidasen der N-Glykosylierungsstatus von sezerniertem NOV in COS-7 Zellen untersucht (Bohr et al., 2010). Dabei wurden

ebenfalls komplexe Kohlenhydratketten nachgewiesen. Im Gegensatz zu unseren Analysen des endogenen bzw. exogenen NOV in Jeg3 Zellen lassen die Ergebnisse dieser Studie jedoch nur bedingt eine Aussage über die physiologische Funktion von NOV zu, da es sich um rekombinantes Ratten-spezifisches NOV handelte, welches aus dem Zellüberstand transfizierter COS-7 Zellen aufgereinigt wurde.

Um die beiden verschiedenen NOV-Formen unabhängig voneinander auf ihre individuelle biologische Funktion in Jeg3 Zellen hin analysieren zu können, wurde kommerziell erworbenes, rekombinantes humanes NOV aus verschiedenen Expressionssystemen verwendet. Das aus murinen Melanomzellen stammende NOV war glykosyliert, entsprach also der sezernierten NOV-Form, und das aus *E. coli* stammende NOV war aufgrund des prokaryotischen Expressionssystems unglykosyliert und repräsentierte somit die intrazelluläre Form. Die Stimulation parentaler Jeg3 Zellen mit der unglykosylierten NOV-Form, welche in den NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden konnte, entsprach dabei nicht direkt der physiologischen Situation, da das rekombinante Protein extrazellulär zugegeben wurde. Jedoch konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden und damit verbundenen Erhöhung der Zellmigrationsrate durch unglykosyliertes NOV nachgewiesen werden. In den Abschnitten 4.4 und 4.5 werden die möglichen Gründe hierfür ausführlich diskutiert.

4.2 Die N-Glykosylierung von NOV hat keine Relevanz für die Präeklampsie-Früherkennung

Aus der Literatur sind zahlreiche Beispiele bekannt, in denen Veränderungen im Glykosylierungsprofil von Glykoproteinen sowohl mit physiologischen als auch mit pathologischen Prozessen wie Migration, Differenzierung, Zellwachstum, Metastasierung und Invasion von Tumorzellen assoziiert sind (Saldova et al., 2008; Blomme et al., 2009; Miyoshi et al., 2010). Daher ist die Analyse von Glykoproteinen auch für die Früherkennung von Krankheiten von Bedeutung. So können z.B. Veränderungen im Glykosylierungsprofil von molekularen Serummarkern in der Krebsdiagnostik genutzt werden (Peracaula et al., 2008). Zahlreiche Studien zu diesem Thema haben in den letzten Jahren den Begriff „Glycom“ als Erweiterung

zum „Genom“ und „Proteom“ geprägt, um die Wichtigkeit dieser posttranslationalen Modifikation von Proteinen für deren biologische Aktivität und Funktion gerade im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen darzustellen (An et al., 2009; Cummings, 2009).

Die Anwendbarkeit des CCN-Proteins NOV als potentieller molekularer Serummarker für die frühzeitige Diagnose von Präeklampsie konnte in der erwähnten ELISA-Studie nicht bestätigt werden. Das Vorkommen einer N-glykosylierten Form von NOV im Überstand von Jeg3-Zellen warf jedoch die Frage auf, ob der Glykosylierungsstatus dieses CCN-Proteins in den analysierten Serumproben mit der Präeklampsiediagnose korrelierte.

Die Analyse der Patientenproben zeigte, dass ausschließlich die glykosylierte Form von NOV in Serum und Plazentagewebe vorhanden waren. Ein Vergleich zwischen präeklampsischen und Kontrollproben zeigte keine Unterschiede im Glykosylierungsmuster. Auch in den untersuchten präeklampsischen Urinproben konnten wir ausschließlich die N-glykosylierte Form von NOV nachweisen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass das CCN-Protein NOV im Zusammenhang mit Präeklampsie nicht nur als quantitativer prädiktiver Marker hinsichtlich der Serum- und Urinlevel ungeeignet ist, sondern auch im Bezug auf den Glykosylierungsstatus keine Relevanz für die Früherkennung einer Präeklampsie haben.

4.3 Der Glykosylierungsstatus von NOV hat keinen Einfluss auf die antiproliferative Wirkung in Jeg3 Zellen

Die Rolle von NOV als Wachstumsregulator wird in der Literatur abhängig vom Zelltyp kontrovers diskutiert. Ursprünglich beschrieben als antiproliferativer Faktor in embryonalen Fibroblasten beim Huhn (Joliot et al., 1992), wurden dem NOV-Protein seither in zahlreichen Studien sowohl positive, als auch negative Einflüsse auf das Wachstum verschiedenster Zelltypen zugeschrieben. In Glioblastomzellen und Ewing-Sarkomzellen korrelierte die Überexpression von NOV mit einer deutlich reduzierten Proliferationsrate (Gupta et al., 2001; Fu et al., 2004; Benini et al., 2005). In humanen leukämischen K562 Zellen führte die Stimulation mit rekombinantem NOV ebenfalls zu einer Verminderung des Zellwachstums (McCallum et al., 2006).

Durch Transfektion von G59-Zellen mit verschiedenen trunkierten NOV-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass der Carboxy-Terminus von NOV die antiproliferative Funktion des Proteins in dieser Glioblastomzelllinie vermittelt (Bleau et al., 2007).

Im Gegensatz zu den genannten Beispielen, in denen NOV eine proliferationshemmende Wirkung zugesprochen wird, zeigten Untersuchungen an Prostata- und Nierenzellkarzinomen einen positiven Einfluss von NOV auf die Zellwachstumsrate (Glukhova et al., 2001; Maillard et al., 2001). In einer 1999 erschienenen Studie konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung mit NOV die Proliferationsrate von 3T3 Fibroblasten konzentrationsabhängig erhöhte (Liu et al., 1999). In einigen Studien wird die Expression einer endogenen 32 kDa-Form von NOV mit trunkiertem Amino-Terminus mit einer erhöhten Proliferationsrate von Tumorzellen assoziiert (Joliot et al., 1992; Planque und Perbal, 2003).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Expression von NOV in Jeg3 Zellen mit einer verminderten Proliferationsrate assoziiert ist (Gellhaus et al., 2004). Diese Ergebnisse konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden.

Um etwaige Unterschiede zwischen intrazellulärem unglykosyliertem NOV und sezerniertem glykosylierten NOV in Bezug auf das Wachstumsverhalten nachzuweisen, wurden parentale Jeg3 Zellen mit rekombinanten NOV-Proteinen stimuliert. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen der antiproliferativen Wirkung des glykosylierten - und der des unglykosylierten NOV. Der negative Effekt von NOV auf das Wachstumsverhalten war demnach unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Proteins.

Bei allen erwähnten Studien, die NOV als negativen Wachstumsregulator beschreiben, wurde die Hemmung der Proliferation als parakrine Wirkung des sezernierten NOV beschrieben. Aufgrund dieser Erkenntnis haben wir die Sekretion von NOV in den NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen mit Hilfe des Sekretionsblockers Brefeldin A (BFA) inhibiert und anschließend die Auswirkung dieser Manipulation auf das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht. Die Ergebnisse bestätigten die parakrine Wirkung von NOV in Bezug auf die Proliferation von Jeg3 Zellen. Da die Stimulation mit beiden NOV-Glykosylierungsformen das Wachstum der parentalen Jeg3 Zellen inhibierte, scheint diese Funktion von NOV auch im Trophoblasten allein auf die parakrine Wirkung des Proteins zurückzuführen zu sein.

4.4 Die migrationsfördernde Wirkung von NOV in Jeg3 Zellen wird ausschließlich von unglykosyliertem NOV vermittelt

Das Einwandern von extravillösen Trophoblastzellen in das maternale Kompartiment, die Dezidua, ist ein essentieller Vorgang in der Entwicklung der frühen Plazenta. Dabei spielen sowohl Invasions- als auch Migrationsvorgänge eine Rolle. Neben Studien an verschiedenen Tumorzelllinien (Benini et al., 2005; Sin et al., 2009; Tzeng et al., 2011), die eine Beteiligung von NOV an Migrations- und Invasionsprozessen beschreiben, konnten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass NOV an der Regulation dieser Prozesse im Trophoblasten beteiligt ist. So führte die Überexpression von NOV in stabil transfizierten Jeg3 Zellen zu einer verstärkten Migration und Invasion im Vergleich zu parentalen Jeg3 Zellen (Yang und Wagener et al., 2011). Die Stimulation von Jeg3 Zellen mit rekombinantem NOV führte ebenfalls zu einer verstärkten Invasion und Migration. Mit Hilfe eines auf Matrigel kultivierten humanen plazentaren Explantmodells des ersten Schwangerschaftstrimesters konnte die Lokalisation von NOV und auch CYR61 an der Invasionsfront und in den in das Matrigel invadierten Trophoblastzellen nachgewiesen werden (Wolf et al., 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun die Rolle der NOV-Glykosylierung bei diesen Zellprozessen untersucht werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation mit unglykosyliertem NOV zu einer signifikanten Erhöhung der Migrationsrate von parentalen Jeg3 Zellen führte, wohingegen das glykosylierte NOV keinen Einfluss auf das Migrationsverhalten der Zellen hatte. Diese Ergebnisse waren zunächst unerwartet, da wir eine parakrine Wirkung des sezernierten NOVs vermuteten und die unglykosylierte Form von NOV die endogene nicht-sezernierte Form des Proteins repräsentiert, welche ausschließlich intrazellulär nachgewiesen werden konnte. Am Beispiel von Glioblastomzellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von NOV zellzyklusabhängig variierte: während in der G0-Phase des Zellzyklus die NOV-Expression fast gänzlich eingestellt war, akkumulierte sich das Protein in der G2/M Phase (Bleau et al., 2007). Wenn diese zellzyklusabhängige Expression von NOV auch bei den von uns verwendeten Jeg3 Zellen der Fall wäre, könnte hier womöglich die Ursache dafür liegen, warum wir die unglykosylierte NOV-Form nicht im Zellüberstand nachweisen konnten. Um dieser Frage nachzugehen, haben wir versucht die Zellen mittels FCS-Entzug und verschiedener Substanzen wie Mimosin und Nocodazol in den verschiedenen Zellzyklusphasen zu arretieren. Die

anschließende FACS-Analyse zeigte jedoch, dass die so behandelten Zellenpopulationen weiterhin unsynchronisiert waren (Daten nicht gezeigt). Zukünftig müssten diese Versuche daher wiederholt bzw. optimiert werden, um konkrete Aussagen über eine zellzyklusabhängige NOV-Expression treffen zu können.

Eine weitere mögliche Erklärung für die migrationsfördernde Wirkung des unglykosylierten NOV könnte in einer 2009 erschienenen Studie an Mammakarzinomzellen zu finden sein (Sin et al., 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass von außen zugegebenes rekombinantes NOV von den Zellen internalisiert wurde und daher ein Mechanismus des „inside-out signalling“ denkbar ist. Unsere Untersuchungen mit dem Sekretionsinhibitor Brefeldin A führten zu keiner Veränderung des Migrationsverhaltens der NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass das glykosylierte sezernierte NOV nicht an der Regulation der Migration beteiligt ist.

Im Gegensatz zur Migration konnten wir keine Beteiligung von NOV an der Invasion von Jeg3 Zellen nachweisen. Dies steht im Widerspruch zu den erwähnten Studien an Tumorzelllinien, sowie zu den bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe an NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen und plazentaren Explants. Wahrscheinlich war die Menge der von den Zellen sezernierten aktiven MMPs durch die Stimulierung mit rekombinantem NOV nicht ausreichend um die Matrigelschicht zu durchdringen. Da die NOV-stimulierten Jeg3 Zellen eine Hochregulation der für die Trophoblastinvasion essentiellen Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 sowie eine verstärkte Aktivierung von MMP-2 zeigten, ist eine Beteiligung von NOV an der Invasion wahrscheinlich. Im Gegensatz zu den untersuchten MMPs, die sowohl durch unglykosyliertes als auch durch glykosyliertes NOV verstärkt exprimiert (MMP-2 und MMP-9) bzw. aktiviert (MMP-2) wurden, konnte die verstärkte Sekretion der MMP-verwandten Proteinase ADAM-12 in den Jeg3/NOV-Transfektanten in Zusammenhang mit der unglykosylierten NOV-Form gebracht werden. ADAM-12 gilt in Kombination mit PAPP-A1 als biochemischer Serummarker für Präeklampsie und intrauterine Wachstumsretardierung (Laigaard et al., 2005; Poon et al., 2008). Bisher unveröffentlichte Studien der Arbeitsgruppe von Prof. M. Knöfler (Abteilung für Geburtshilfe und feto-maternale Medizin der Universitätsklinik für Frauenheilkunde der medizinischen Universität Wien) postulieren die Beteiligung von ADAM-12 an der Regulation der Invasion des extravillösen Trophoblasten und zeigen die Sekretion der löslichen Form von ADAM-12 (ADAM-12S) in Jeg3 Zellüberständen. Die im

Rahmen dieser Arbeit gefundene Verstärkung der ADAM-12 Sekretion in Abhängigkeit von unglykosyliertem NOV gibt, neben der Aktivierung von MMP-2, einen weiteren Anhaltspunkt für die Rolle von NOV in der Trophoblastinvasion sowie einen unterstützenden Hinweis auf die Beteiligung von ADAM-12 in diesem für die Plazentaentwicklung essentiellen Prozess.

4.5 Die molekularen Mechanismen der NOV-regulierten Prozesse in Jeg3 Trophoblastzellen

Wie in den zwei vorherigen Abschnitten beschrieben, scheint NOV eine duale Funktion in der Regulation des humanen extravillösen Trophoblasten innezuhaben: einerseits wurde die Proliferation von Jeg3 Zellen durch NOV-Überexpression und auch durch die Stimulation mit rekombinantem NOV inhibiert, andererseits förderte NOV die Migration dieser Zellen. Dabei konnten wir in Bezug auf die Migration eindeutige Unterschiede zwischen der Wirkung des unglykosylierten und der Wirkung des glykosylierten NOV finden. Dass das NOV-Protein auf der einen Seite stimulierende, auf der anderen Seite inhibierende Funktionen im gleichen Zelltyp übernimmt, wurde 2005 auch in Ewing-Sarkomzellen nachgewiesen, wo die Überexpression von NOV zu einer reduzierten Proliferationsrate, sowie einer erhöhten Migrations- und Invasionsrate der Zellen führte (Benini et al., 2005). Um die grundlegenden molekularen Mechanismen der NOV-Regulation in Jeg3 Zellen weiter aufzuklären, haben wir zunächst diejenigen Signaltransduktionskaskaden untersucht, die im Zusammenhang mit NOV eine Rolle spielen und im Hinblick auf die Regulation der Proliferation und der Migration/Invasion des humanen Trophoblasten beschrieben wurden.

Unter den verschiedenen Signalwegen, die durch zahlreiche Zytokine und Chemokine aktiviert werden und die Funktion des humanen Trophoblasten regulieren (siehe Einleitung, Abb. 1.3), sind insbesondere der PI3K/Akt-Signalweg und der MAPK/ERK-Signalweg auch im Zusammenhang mit NOV in verschiedenen Zelltypen beschrieben worden. So wurde in der humanen leukämischen Zelllinie K562 eine Verbindung zwischen der Aktivierung bzw. Deaktivierung der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 durch NOV im Hinblick auf die Wachstumsregulation dieser Zellen gezeigt (McCallum et al., 2011). Die migrationsfördernde Wirkung von NOV in

Chondrosarkomzellen und Osteosarkomzellen ist assoziiert mit der Aktivierung des PI3K/Akt Signalweges (Huang et al., 2011; Tzeng et al., 2011).

4.5.1 Aktivierung von Akt und ERK1/2 in NOV-stimulierten Jeg3 Zellen

Zunächst wurde die Aktivierung von Akt und ERK1/2 in NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen über den Nachweis von phosphoryliertem Akt- bzw. ERK1/2- untersucht. Dabei ließ sich jedoch keine klare Korrelation zwischen NOV und Akt bzw. ERK1/2 erkennen (Daten nicht gezeigt). Wir nehmen an, dass die durch stabile Transfektion erreichte Überexpression von NOV in Jeg3 Zellen, die nicht dem physiologischen endogenen NOV-Expressionslevel entspricht, dazu führte, dass die untersuchten Signalkaskaden, deren Aktivierung einem fein abgestimmten zeitlichen Muster unterliegt, nicht mit NOV assoziiert waren, da es zu einer Überaktivierung der Signalwege kam. Auch die bereits erwähnte zellzyklusabhängige Regulation der NOV-Expression könnte dabei eine Rolle spielen.

Die Stimulation parentaler Jeg3 Zellen mit rekombinantem NOV führte jedoch zu einer kontinuierlichen Aktivierung von Akt, wobei das zeitliche Muster der Aktivierung der beiden verschiedenen NOV Formen Unterschiede aufwies.

Es konnte ebenfalls eine transiente Aktivierung bzw. Phosphorylierung von ERK1/2 in Zusammenhang mit der Stimulation durch rekombinantes NOV gebracht werden. Hierbei ergab sich jedoch kein Unterschied zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem NOV. Der Einsatz spezifischer Inhibitoren der beiden Signalwege zeigte den direkten Zusammenhang zwischen NOV und der Aktivierung von Akt und ERK1/2.

Da die Aktivierung von Akt und ERK1/2 in vielen Zellsystemen gerade im Hinblick auf Migrationsprozesse mit der Aktivierung der fokalen Adhäsionskinase (FAK) assoziiert ist (King et al., 1997; Sachdev et al., 2002; Ren et al., 2008; Tureckova et al., 2009), wurde ebenfalls die Auswirkung der NOV-Stimulation auf die FAK-Phosphorylierung in Jeg3 Zellen untersucht. Hier konnte jedoch kein direkter Zusammenhang gefunden werden. Vielmehr zeigten die Zellen eine konstitutive Aktivierung dieser Kinase unabhängig von NOV. Dies ist damit zu erklären, dass die Jeg3 Zellen eine basale Migrationsfähigkeit zeigten, was auch in anderen Studien am gleichen Zelltyp bereits gezeigt wurde (Wolf et al., 2010; Zhang et al., 2011) und wahrscheinlich mit dem Tumorausprung dieser Chorionkarzinomzelllinie zusammenhängt. Wie in Abschnitt

4.5.3 beschrieben, wurde durch die NOV-Überexpression bzw. durch die Stimulation mit unglykosyliertem NOV und damit verbundene Aktivierung von Akt und ERK1/2 die Migration in Jeg3 Zellen also nicht induziert, sondern verstärkt.

4.5.2 Die sauerstoffunabhängige Aktivierung von Hif-1 α durch NOV

In unserer Arbeitsgruppe konnte ein Zusammenhang zwischen NOV und dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 α (Hif-1 α) gezeigt werden (Wolf et al., 2010). Da bekannt ist, dass das Hif-1 α Protein auch unter Normoxie, z.B. durch inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α , aktiviert bzw. stabilisiert werden kann (Zhou et al., 2003; Frede et al., 2005), und auch im Zusammenhang mit dem CCN-Protein CYR61 bereits die sauerstoffunabhängige Regulation von Hif-1 α am Beispiel von Magenkarzinomzellen beschrieben wurde (Lin et al., 2008), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung der NOV-Stimulation auf Hif-1 α untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Jeg3 Zellen mit glykosyliertem rNOV zu einer signifikanten Hochregulation der Hif-1 α Expression bzw. Stabilisierung führte. Zwar konnte in den darauffolgenden Experimenten ein direkter Zusammenhang zwischen der Hif-1 α Aktivierung und dem PI3K/Akt-Signalweg nachgewiesen werden - eine Korrelation, die z.B. auch in Prostatakarzinom Zellen gezeigt wurde (Jiang et al. 2001) – jedoch führte in den mitgeführten Kontrollproben auch die Stimulierung mit unglykosyliertem rNOV zur Stabilisierung des Hif-1 α Proteins. Daher lässt sich keine konkrete Aussage darüber treffen, ob der Glykosylierungsstatus von NOV im Hinblick auf Hif-1 α relevant ist. Im Allgemeinen war die Aktivierung von Hif-1 α in Jeg3 Zellen sehr divergent, d.h. dass auch in den Kontrollproben, welche nicht mit NOV stimuliert wurden, wiederholt eine starke Expression von Hif-1 α detektiert wurde. Daher bleibt unklar, ob NOV mit der sauerstoffunabhängigen Aktivierung von Hif-1 α in Jeg3 Zellen in Zusammenhang steht. Es ist bekannt, dass die Hif-1 α Expression in vielen Tumorarten mit einer negativen Prognose assoziiert ist (Maynard und Ohh, 2007). Auch während der Plazentaentwicklung spielt sowohl die sauerstoffabhängige als auch die sauerstoffunabhängige Regulation von Hif-1 α eine Rolle (Patel et al., 2010; Pringle et al., 2010). Im Rahmen der hier durchgeführten Versuche lässt sich die Stabilisierung von Hif-1 α nicht eindeutig in Abhängigkeit von NOV zeigen.

4.5.3 Die Involvierung der MAPK/ERK- und der PI3K/Akt-Signalkaskade an den NOV-vermittelten Zellprozessen

Die Unterschiede zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem NOV im zeitlichen Aktivierungsmuster von Akt könnte im Zusammenhang mit der unterschiedlichen Wirkung beider NOV-Formen auf die Migration der Jeg3 Zellen stehen (siehe Abschnitt 4.4). Da sich bei der ERK1/2 Aktivierung kein Unterschied zwischen glykosyliertem und unglykosyliertem NOV zeigte, könnte der MAPK/ERK-Signalweg die NOV-abhängige Proliferationsreduktion vermitteln, bei der - wie in Abschnitt 4.3 beschrieben – die NOV-Glykosylierung keine Rolle spielte.

Um die beiden untersuchten Signalwege mit den Funktionen von NOV in Jeg3 Zellen in Korrelation zu bringen, wurden das Proliferations-, sowie das Migrationsverhalten der NOV-stimulierten Zellen unter dem Einfluss der erwähnten spezifischen Inhibitoren untersucht. Die Analyse der Proliferationsassays unter Inhibitoreinfluss zeigte, dass die Zellen im Falle der ERK1/2-Inhibition bereits nach 48 h vermehrt abstarben. Dies ist ein Hinweis für die essentielle Rolle dieses Signalweges in der Proliferationsregulation von Jeg3 Zellen. Dieses konnte auch in einer Studie von 2009 am Beispiel von Adiponektin einem Koregulator des Leptin-Hormons gezeigt werden, welches nicht nur im Fettstoffwechsel eine Rolle spielt, sondern auch im Zusammenhang mit Plazenta-Entwicklung beschrieben wurde (Henson und Castracane, 2006; Benaitreau et al., 2009). Auch die Inhibition von Akt führte in unseren Experimenten zu einem vermehrten Zelltod, dies konnte jedoch erst nach 72 h beobachtet werden. Da die antiproliferative Wirkung des rekombinanten NOV – sowohl der unglykosylierten als auch der glykosylierten Form - erst nach 72 h signifikant war, kann hier keine konkrete Aussage über die Rolle der untersuchten Signalkaskaden in der NOV-abhängigen Proliferationsinhibition gemacht werden.

Der Effekt von NOV auf die Zellmigration wurde in einem Zeitraum von 24 h gemessen, in dem sich die Blockade des PI3K/Akt- und des MAPK/ERK-Signalweges nicht auf die Zellvitalität auswirkte. Die Tatsache, dass die durch unglykosyliertes NOV induzierte Migrationszunahme durch Blockade beider Signalwege wieder reduziert wurde, warf die Frage auf, ob es eine Verbindung der beiden Signalkaskaden gibt, wie es z.B. bei der Arteriogenese in den Tiermodellen Maus und Zebrafisch gezeigt wurde (Ren et al., 2010), oder auch in EGF-abhängigen Zellprozessen in Mammakarzinomzellen der Fall ist (Aksamitiene et al., 2010). Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges in den NOV-stimulierten Jeg3 Zellen hatte

jedoch keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von ERK1/2. Ebenso wenig zeigte sich ein Einfluss der MAPK/ERK-Blockade auf die Phosphorylierung von Akt. Damit konnte gezeigt werden, dass beide Signalkaskaden unabhängig voneinander durch NOV aktiviert werden. Unterstützt werden diese Ergebnisse durch eine Studie an der extravillösen Trophoblast-Zelllinie HTR8/Svneo, in der die Stimulation mit dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) die PI3K/Akt- und die MAPK/ERK-Signalkaskade unabhängig voneinander aktiviert, was in beiden Fällen zu einer erhöhten Expression von MMP-9 und TIMP-1 führte (Qiu et al., 2005), ein weiterer Hinweis für die Beteiligung beider Signalkaskaden an der Trophoblastinvasion.

4.5.4 Die Rolle von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ als NOV Rezeptor in Jeg3 Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass NOV in Jeg3 Zellen verschiedene Signalkaskaden unabhängig voneinander aktiviert. Bisher unbekannt sind jedoch die Rezeptoren, über die die NOV-abhängigen Zellprozesse (Proliferation und Migration) in Jeg3 Zellen vermittelt werden. Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen CCN-abhängigen Zellprozesse wird über Integrine vermittelt (Chen und Lau, 2009). Adhäsions- und Migrationsstudien an humanen Endothelzellen der Nabelschnurvenen (HUVEC) zeigen eine direkte Bindung von NOV an die Integrine $\alpha \nu \beta 3$, $\alpha \nu \beta 5$ und $\alpha 5 \beta 1$ (Lin et al., 2003), eine Publikation von 2005 beschreibt NOV zusätzlich als direkten Liganden von Integrin $\alpha 6 \beta 1$ in primären Fibroblasten und postuliert eine Funktion von NOV in der dermalen Wundheilung (Lin et al., 2005). Bisherige Studien an Jeg3 Zellen zeigen die Expression der Integrin-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$ und $\beta 4$ in dieser malignen Trophoblastzelllinie (Zygmunt et al. 1998, Burleigh et al. 2007, Lash et al. 2007, Ma et al. 2009). Die frühe Entwicklung der humanen Plazenta, genauer gesagt die Differenzierung des Trophoblasten in den invasiven Phänotyp zeichnet sich durch einen Wechsel in der Integrin-Expression von $\alpha 6 \beta 4$ über $\alpha 5 \beta 1$ zu $\alpha 1 \beta 1$ aus (Damsky et al., 1992, 1994)

Eine Übereinstimmung der bekannten NOV-Integrin-Rezeptoren und des verwendeten Zellsystems ergibt sich also bei den Untereinheiten $\alpha 5$ und $\beta 1$, deren Expression in den parentalen Jeg3 Zellen nachgewiesen wurde. Die Stimulation parentaler Jeg3 Zellen mit rekombinantem NOV hatte keine signifikante Auswirkung auf die Expression dieser beiden Untereinheiten, was sich durch die Tatsache erklären lässt, dass sich Integrine durch einen „Recycling“-Mechanismus und nicht in

erster Linie durch eine Regulation der Expressionslevel auszeichnen (Jones et al., 2006; White et al., 2007).

Die Blockierung des Integrin-Bindungsmotives RGD mit Hilfe eines synthetischen RGD-Peptids inhibierte die NOV-abhängige Migrationszunahme. Im Zusammenhang mit der NOV-abhängigen Lokalisationsänderung von Integrin $\alpha 5 \beta 1$ vom Zytoplasma zur Zellmembran zeigten diese Ergebnisse, dass Integrin $\alpha 5 \beta 1$ als Rezeptor die NOV-abhängige Migration in Jeg3 vermittelt.

Durch die Herunterregulierung der Integrin $\alpha 5$ -Expression mittels siRNA sollte diese These weiter unterstützt werden, da in der Literatur nur die Kombination der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ mit $\beta 1$, nicht aber mit anderen β -Untereinheiten beschrieben wurde (Übersicht in Buck und Horwitz, 1987). Der Effekt des unglykosylierten NOV auf das Migrationsverhalten wurde durch den Knockdown von Integrin $\alpha 5$ aufgehoben. Die Analyse der Akt- und der ERK1/2-Aktivierung unter dem Einfluss des Integrin $\alpha 5$ -Knockdowns zeigte einen direkten Zusammenhang zwischen NOV, Integrin $\alpha 5 \beta 1$ und dem PI3K/Akt-Signalweg, wogegen der MAPK/ERK-Signalweg nicht beeinträchtigt war. Da die Inhibition des MAPK/ERK-Signalweges wie in Abschnitt 4.4.3 beschrieben ebenfalls die Migrationszunahme durch unglykosyliertes NOV aufhob, ist die Existenz eines Integrin $\alpha 5 \beta 1$ -unabhängigen Signalweges, der ebenfalls an der Regulation der Migration in Jeg3 Zellen beteiligt ist, wahrscheinlich.

Die antiproliferative Wirkung von NOV war durch den Integrin $\alpha 5$ -Knockdown nicht beeinträchtigt – weder in den Jeg3/NOV-Transfektanten, noch in den NOV-stimulierten Jeg3 Zellen. Daher ist anzunehmen, dass ein weiterer NOV-Rezeptor in Jeg3 Zellen existiert, der die NOV-abhängige Proliferationsinhibition vermittelt. Untersuchungen des Notch-Rezeptors, welcher in NOV-knockout Studien in Zusammenhang mit der Proliferationsregulation von murinen vaskulären glatten Muskelzellen beschrieben wurde (Shimoyama et al., 2010), lieferten in dieser Hinsicht keine Ergebnisse in Jeg3 Zellen. Des Weiteren wurde die Aktivierung des EGF-Rezeptors in Jeg3 Zellen in Abhängigkeit von NOV untersucht, da bekannt ist, dass die NOV/Notch-Interaktion in Myoblasten über die Bindung an die EGF-Domäne des Notch-Rezeptors stattfindet (Sakamoto et al., 2002). Jedoch wurde auch in diesem Fall keine NOV-abhängige Aktivierung dieses Rezeptors nachgewiesen. Über welchen Rezeptor die antiproliferative Wirkung von NOV in Jeg3 Zellen vermittelt wird, konnte also im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Eine Studie an Granularvorläuferzellen von Ratten postuliert die Involvierung von Integrin

$\alpha\beta 3$ an NOV-abhängigen Zellprozessen (Le Dreau et al., 2010). Die Stimulation dieser Zellen mit rekombinantem NOV resultierte in einer erhöhten Migrationsrate sowie einer reduzierten Proliferationsrate in Abhängigkeit von Integrin $\alpha\beta 3$, wobei jedoch keine Aussage über den Glykosylierungsstatus des rekombinanten NOV gemacht wurde. Da die bereits erwähnte duale Funktion des NOV-Proteins auch in unseren Versuchen an Jeg3 Zellen gezeigt wurde, könnte Integrin $\alpha\beta 3$ der Rezeptor-Kandidat für die NOV-abhängige Proliferationsreduktion und/oder den Integrin $\alpha\beta 1$ -unabhängigen Migrationssignalweg sein. Diese These, sowie die mögliche Beteiligung anderer Integrine müsste in weiterführenden Analysen verifiziert werden.

Das folgende Schema fasst die in dieser Arbeit beschriebenen durch NOV induzierten Signalkaskaden, sowie die Rolle der beiden Glykosylierungsformen von NOV in Jeg3 Zellen zusammen (Abb. 4.1):

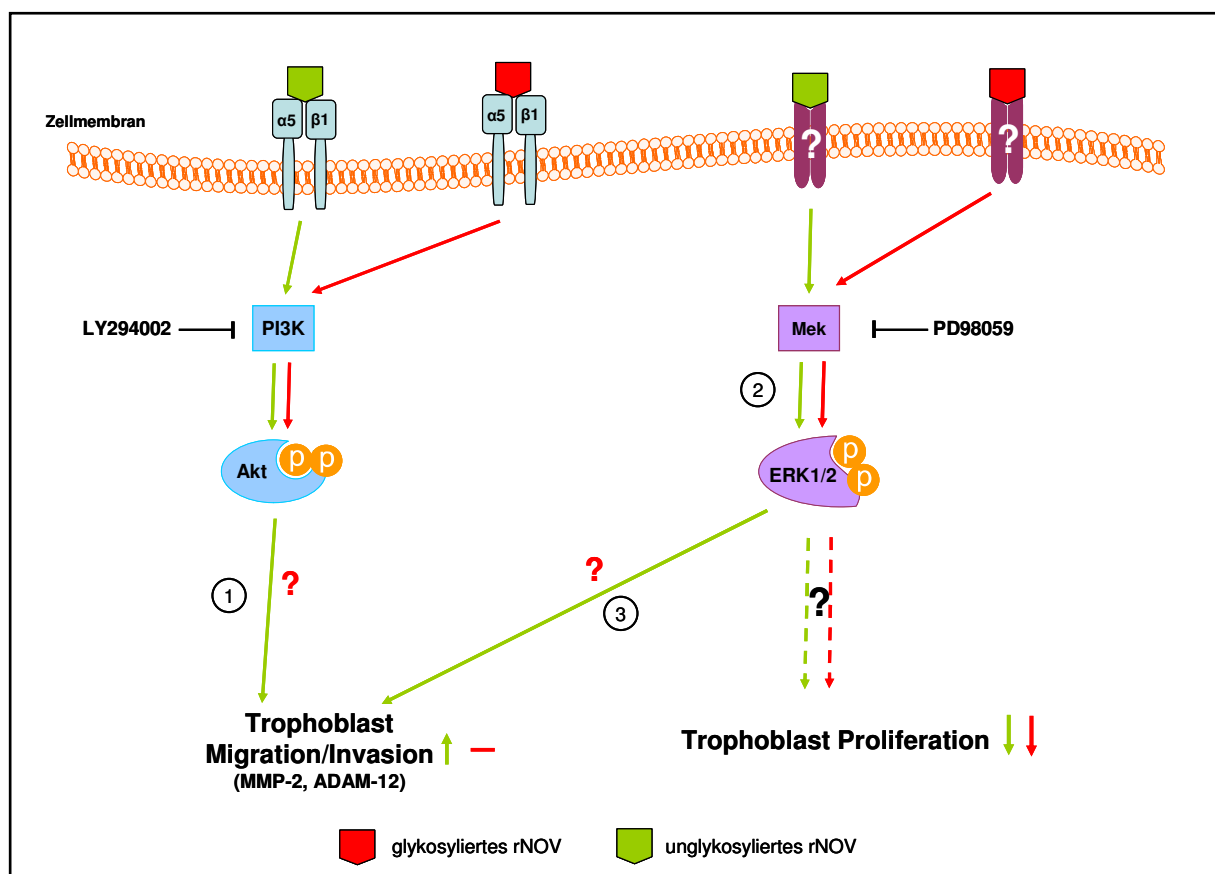


Abb. 4.1 Die molekularen Wirkmechanismen von NOV in Jeg3 Trophoblastzellen

(1) Unglykosyliertes NOV verstärkt die Migration über Bindung an Integrin $\alpha\beta 1$ und die anschließende Aktivierung von PI3K und Akt. Die NOV-abhängige Aktivierung von MMP-2 und die verstärkte Sekretion von ADAM-12 durch die Stimulierung mit unglykosyliertem NOV geben einen Hinweis auf eine Beteiligung von NOV an der Trophoblastinvasion. (2) Die antiproliferative Wirkung von NOV ist unabhängig vom Glykosylierungsstatus und wird über einen bisher unbekannten Rezeptor wahrscheinlich über die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1 und 2 vermittelt. (3) Integrin $\alpha\beta 1$ -unabhängiger Signalweg, der durch unglykosyliertes NOV aktiviert wird, führt zur Erhöhung der Migration via ERK1/2.

4.6 Ausblick

Die Funktion der beiden Glykosylierungsformen von NOV in Jeg3 Zellen könnte weiter differenziert werden, indem man die Glykosylierung des Proteins in den NOV-Transfektanten mittels Punktmutation an den putativen N-Glykosylierungsstellen Asn97 und/oder Asn280; (Chevalier et al., 1998) verhindert und so Zellen erhält, die ausschließlich die unglykosylierte NOV-Form exprimieren. Diese könnten dann im Hinblick auf die Proliferation und Migration/Invasion und die involvierten Signalkaskaden analysiert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob das unglykosylierte rekombinante NOV tatsächlich von den Jeg3 Zellen internalisiert wird und über einen Mechanismus des „inside-out-signalling“ die Migration verstärkt - wie es auch im Falle von Mammakarzinomzellen gezeigt wurde (Sin et al., 2009) - könnte das rekombinante NOV mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert werden, um so die Aufnahme in die Zelle beobachten zu können (siehe Sin et al. 2009).

Die in dieser Arbeit gezeigte Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade in Abhängigkeit von NOV und die Involvierung dieses Signalweges in die Migrationsregulation könnte durch Analyse der Aktivierung potentieller „downstream“-Kinasen wie mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und GSK3 (Glykogen Synthase Kinase 3) bzw. deren Blockade durch selektive Inhibitoren oder Knockdown mittels siRNA weiter analysiert werden. Um die Involvierung der in Jeg3 Zellen konstitutiv aktivierten Kinase FAK im Hinblick auf die NOV-induzierte Migration zu klären, könnte ebenfalls eine Herunterregulation der FAK-Expression mittels siRNA Aufschluss geben.

Im Falle der MAPK/ERK-Signalkaskade würde die Aktivierung der MAP Kinasen Ras und Raf weitere Einblicke geben, da Studien an Mäusen eine Beteiligung dieser Faktoren an der Entwicklung der murinen Plazenta gezeigt haben (Galabova-Kovacs et al., 2006).

Die nachgewiesene NOV-abhängige Regulation von Matrixmetalloproteinasen, sowie von ADAM-12 könnte mit Hilfe der selektiven Inhibitoren LY249002 (PI3K/Akt-Blockade) und PD98059 (MAPK/ERK-Blockade) in Zusammenhang mit den durch NOV aktivierten Signalkaskaden gebracht werden.

In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Mikroarray-Untersuchungen von Jeg3/NOV-Transfektanten haben eine Hochregulation der Expression des Endothelin-Rezeptors Typ B gezeigt. Mit Hilfe einer Ko-Immunpräzipitation könnte man die potentielle Bindung von NOV an diesen Rezeptor untersuchen und so möglicherweise den

bisher unbekannten zweiten NOV-Rezeptor für die Regulation der Proliferation in Jeg3 Zellen identifizieren. Es ist ebenfalls denkbar, dass neben Integrin $\alpha 5\beta 1$ andere Integrine wie z.B. $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$ und $\alpha 6\beta 1$ an den NOV-abhängigen Zellprozessen beteiligt sind. Knockdown Analysen der einzelnen Integrin Untereinheiten könnten hierbei weiteren Aufschluss geben.

Neben der malignen Trophoblast-Zelllinie Jeg3, die sowohl Trophoblast- wie auch Tumoreigenschaften aufweist, könnten Studien an primären Trophoblastzellen bzw. benignen Trophoblast-Zelllinien wie HTR8/SVneo (Graham et al., 1993) und SGHPL-4 und -5 (Choy und Manyonda, 1998; Choy et al., 2000) weitere Einblicke in die Rolle der CCN-Proteins NOV in der Regulation des extravillösen Trophoblasten geben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Migration und Invasion des extravillösen Trophoblasten in das maternale Kompartiment, die Dezidua, ist eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung der Plazenta, die den Stoffaustausch zwischen maternalem und fötalem Blutkreislauf gewährleistet. Die extravillösen Trophoblastzellen bewirken eine Umwandlung der maternalen Spiralarterien in der Dezidua zu elastisch erweiterten Gefäßen mit geringem Widerstand, was zu einer erhöhten Durchflussleistung des Blutstroms führt und so die Versorgung des Embryos mit Sauerstoff und Nährstoffen garantiert. In der schwangerschaftsbedingten Erkrankung Präeklampsie ist dieser Vorgang der Trophoblastinvasion gestört, wodurch es zu einer Unterversorgung des Embryos und daher häufig zu einer intrauterinen Wachstumsretardierung kommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle des CCN-Proteins NOV (CCN3), welches in extravillösen Trophoblastzellen exprimiert wird, bei der Regulation der Proliferation und der Migration/Invasion des humanen extravillösen Trophoblasten am Modell der malignen Trophoblastzelllinie Jeg3 untersucht. Dabei lag ein besonderer Fokus auf der Entschlüsselung der Signalwege, über die NOV verschiedene Prozesse wie Proliferation und Migration/Invasion in Jeg3 Zellen steuert.

Es wurden zwei verschiedene Glykosylierungsformen von NOV in stabil transfizierten Jeg3 Zellen identifiziert: eine 48 kDa unglykosylierte intrazelluläre Form sowie eine 55 kDa N-glykosylierte sezernierte Form. Funktionsanalysen von NOV-überexprimierenden Jeg3 Zellen zeigten ein signifikant reduziertes Wachstumsverhalten im Vergleich zu Kontrollzellen, wohingegen die Migrationsraten signifikant erhöht waren.

Um die beiden in Jeg3 Zellen vorkommenden NOV-Formen unabhängig voneinander auf ihre individuelle biologische Funktion hin analysieren zu können, wurden parentale Jeg3 Zellen mit glykosyliertem bzw. unglykosyliertem rekombinantem NOV stimuliert. Dabei stellte sich heraus, dass die migrationsfördernde Wirkung von NOV ausschließlich von der unglykosylierten Form vermittelt wird, wohingegen die antiproliferativen Eigenschaften von NOV unabhängig vom Glykosylierungsstatus des Proteins sind.

Die Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Wirkmechanismen der NOV-induzierten Prozesse in Jeg3 Zellen zeigte eine Beteiligung der PI3K/Akt- und der MAPK/ERK-Signalkaskade, die beide unabhängig voneinander durch NOV aktiviert

wurden. Durch siRNA-Analysen konnte Integrin $\alpha 5\beta 1$ als Rezeptor für NOV identifiziert werden, der die migrationsfördernde Wirkung von unglykosyliertem NOV über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges vermittelt. Eine NOV-abhängige Hochregulierung der Expression von Matrixmetalloproteinasen MMP-2 und MMP-9 auf mRNA Ebene, eine erhöhte Aktivierung von MMP-2, sowie eine verstärkte Sekretion von ADAM-12 durch unglykosyliertes NOV gaben Hinweise auf die Rolle dieses CCN-Proteins in der Trophoblastinvasion. Es wurde außerdem ein zweiter Integrin $\alpha 5\beta 1$ -unabhängiger Signalweg gefunden, der die Migration über die Aktivierung der MAP Kinasen ERK1 und ERK2 steuert. Der Rezeptor, der die NOV-abhängige Proliferationsreduktion vermittelt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden.

Die Glykosylierung von NOV in Plazentagewebe, Blutserum und Urin von Präeklampsie-Patientinnen korrelierte nicht mit der Diagnose dieser schwangerschaftsbedingten hypertensiven Erkrankung. Jedoch zeigte sich eine signifikante Erhöhung des NOV-Proteins im Serum von late-onset Präeklampsie-Patientinnen.

Die Untersuchungen an Jeg3 Trophoblastzellen zeigten eine wichtige Rolle der NOV-Glykosylierung im Hinblick auf die Balance zwischen der Proliferation und der Migration/Invasion des Trophoblasten. So könnte eine Fehlregulation von unglykosyliertem und glykosyliertem NOV mit Veränderungen in der Trophoblastfunktion, also einem Ungleichgewicht in der Proliferation und Migration/Invasion, verbunden sein. Dieses Ungleichgewicht könnte zu der in der Präeklampsie beobachteten mangelnden Invasion des Trophoblasten beitragen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aksamitiene E, Kholodenko BN, Kolch W, Hoek JB, Kiyatkin A (2010).** PI3K/Akt-sensitive MEK-independent compensatory circuit of ERK activation in ER-positive PI3K-mutant T47D breast cancer cells. *Cell Signal* 22(9): 1369-1378.
- Albelda SM, Buck CA (1990).** Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 4(11): 2868-2880.
- An HJ, Kronewitter SR, de Leoz ML, Lebrilla CB (2009).** Glycomics and disease markers. *Curr Opin Chem Biol* 13(5-6): 601-607.
- Aplin JD (1993).** Expression of integrin alpha 6 beta 4 in human trophoblast and its loss from extravillous cells. *Placenta* 14(2): 203-215.
- Aplin JD, Lacey H, Haigh T, Jones CJ, Chen CP, Westwood M (2000).** Growth factor-extracellular matrix synergy in the control of trophoblast invasion. *Biochem Soc Trans* 28(2): 199-202.
- Benaitreau D, Dieudonne MN, Dos Santos E, Leneuve MC, Mazancourt P, Pecquery R (2009).** Antiproliferative effects of adiponectin on human trophoblastic cell lines JEG-3 and BeWo. *Biol Reprod* 80(6): 1107-1114.
- Benini S, Perbal B, Zambelli D, Colombo MP, Manara MC, Serra M, Parenza M, Martinez V, Picci P, Scotlandi K (2005).** In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type. *Oncogene* 24(27): 4349-4361.
- Benveniste R, Speeg KV, Jr., Long A, Rabinowitz D (1978).** Concanavalin-A stimulates human chorionic gonadotropin (hCG) and hCG-alpha secretion by human choriocarcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 84(4): 1082-1087.
- Benirschke K und Kaufmann P (eds.) (2000).** Pathology of the human placenta. 4th edn. Springer-Verlag, New York.
- Bilban M, Tauber S, Haslinger P, Pollheimer J, Saleh L, Pehamberger H, Wagner O, Knofler M (2010).** Trophoblast invasion: assessment of cellular models using gene expression signatures. *Placenta* 31(11): 989-996.
- Bischof P, Meisser A, Campana A (2000).** Paracrine and autocrine regulators of trophoblast invasion--a review. *Placenta* 21 Suppl A: S55-60.
- Bleau AM, Planque N, Lazar N, Zambelli D, Ori A, Quan T, Fisher G, Scotlandi K, Perbal B (2007).** Antiproliferative activity of CCN3: involvement of the C-terminal module and post-translational regulation. *J Cell Biochem* 101(6): 1475-1491.
- Bleau AM, Planque N, Perbal B (2005).** CCN proteins and cancer: two to tango. *Front Biosci* 10: 998-1009.
- Blomme B, Van Steenkiste C, Callewaert N, Van Vlierberghe H (2009).** Alteration of protein glycosylation in liver diseases. *J Hepatol* 50(3): 592-603.
- Bohr W, Kupper M, Hoffmann K, Weiskirchen R (2010).** Recombinant expression, purification, and functional characterisation of connective tissue growth factor and nephroblastoma-overexpressed protein. *PLoS One* 5(12): e16000.
- Bornstein P (1995).** Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol* 130(3): 503-506.
- Bornstein P, Sage EH (2002).** Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol* 14(5): 608-616.
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR (1991).** Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114(6): 1285-1294.
- Brigstock D, Lau L, Perbal B (2005).** Report and abstracts of the 3rd International Workshop on the CCN Family of Genes. St Malo, France, 20-23 October 2004. *J Clin Pathol* 58(5): 463-478.
- Brigstock DR (1999).** The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. *Endocr Rev* 20(2): 189-206.

- Brosens IA, Robertson WB, Dixon HG (1970).** The role of the spiral arteries in the pathogenesis of pre-eclampsia. J Pathol 101(4): Pvi.
- Brosens JJ, Pijnenborg R, Brosens IA (2002).** The myometrial junctional zone spiral arteries in normal and abnormal pregnancies: a review of the literature. Am J Obstet Gynecol 187(5): 1416-1423.
- Brown MA, Lindheimer MD, de Swiet M, Van Assche A, Moutquin JM (2001).** The classification and diagnosis of the hypertensive disorders of pregnancy: statement from the International Society for the Study of Hypertension in Pregnancy (ISSHP). Hypertens Pregnancy 20(1): IX-XIV.
- Buck CA, Horwitz AF (1987).** Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. Annu Rev Cell Biol 3: 179-205.
- Burleigh DW, Kendzioriski CM, Choi YJ, Grindle KM, Grendell RL, Magness RR, Golos TG (2007).** Microarray analysis of BeWo and JEG3 trophoblast cell lines: identification of differentially expressed transcripts. Placenta 28(5-6): 383-389.
- Burridge K, Chrzanowska-Wodnicka M (1996).** Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu Rev Cell Dev Biol 12: 463-518.
- Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E (2002).** Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. J Clin Endocrinol Metab 87(6): 2954-2959.
- Caniggia I, Grisaru-Gravnosky S, Kuliszewsky M, Post M, Lye SJ (1999).** Inhibition of TGF-beta 3 restores the invasive capability of extravillous trophoblasts in preeclamptic pregnancies. J Clin Invest 103(12): 1641-1650.
- Cantley LC (2002).** The phosphoinositide 3-kinase pathway. Science 296(5573): 1655-1657.
- Cartwright JE, Kenny LC, Dash PR, Crocker IP, Aplin JD, Baker PN, Whitley GS (2002a).** Trophoblast invasion of spiral arteries: a novel in vitro model. Placenta 23(2-3): 232-235.
- Cartwright JE, Tse WK, Whitley GS (2002b).** Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. Exp Cell Res 279(2): 219-226.
- Cary LA, Klinghoffer RA, Sachsenmaier C, Cooper JA (2002).** SRC catalytic but not scaffolding function is needed for integrin-regulated tyrosine phosphorylation, cell migration, and cell spreading. Mol Cell Biol 22(8): 2427-2440.
- Caswell PT, Norman JC (2006).** Integrin trafficking and the control of cell migration. Traffic 7(1): 14-21.
- Chen CC, Lau LF (2009).** Functions and mechanisms of action of CCN matricellular proteins. Int J Biochem Cell Biol 41(4): 771-783.
- Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, Laurent M, Alami J, Schofield PN, Perbal B (1998).** novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. Am J Pathol 152(6): 1563-1575.
- Choy MY, Manyonda IT (1998).** The phagocytic activity of human first trimester extravillous trophoblast. Hum Reprod 13(10): 2941-2949.
- Choy MY, St Whitley G, Manyonda IT (2000).** Efficient, rapid and reliable establishment of human trophoblast cell lines using poly-L-ornithine. Early Pregnancy 4(2): 124-143.
- Chun D, Braga C, Chow C, Lok L (1964).** Clinical Observations on Some Aspects of Hydatidiform Moles. J Obstet Gynaecol Br Commonw 71: 180-184.
- Clark EA, Hynes RO (1997).** 1997 keystone symposium on signal transduction by cell adhesion receptors. Biochim Biophys Acta 1333(3): R9-16.
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992).** The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. Science 258(5081): 478-480.
- Cummings RD (2009).** The repertoire of glycan determinants in the human glycome. Mol Biosyst 5(10): 1087-1104.
- Damsky CH, Fitzgerald ML, Fisher SJ (1992).** Distribution patterns of extracellular matrix components and adhesion receptors are intricately modulated during first trimester cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway, in vivo. J Clin Invest 89(1): 210-222.

- Damsky CH, Librach C, Lim KH, Fitzgerald ML, McMaster MT, Janatpour M, Zhou Y, Logan SK, Fisher SJ (1994).** Integrin switching regulates normal trophoblast invasion. Development 120(12): 3657-3666.
- Ellis PD, Metcalfe JC, Hyvonen M, Kemp PR (2003).** Adhesion of endothelial cells to NOV is mediated by the integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha 5 \beta 1$. J Vasc Res 40(3): 234-243.
- Feinberg RF, Kao LC, Haimowitz JE, Queenan JT, Jr., Wun TC, Strauss JF, 3rd, Kliman HJ (1989).** Plasminogen activator inhibitor types 1 and 2 in human trophoblasts. PAI-1 is an immunocytochemical marker of invading trophoblasts. Lab Invest 61(1): 20-26.
- Ferretti C, Bruni L, Dangles-Marie V, Pecking AP, Bellet D (2007).** Molecular circuits shared by placental and cancer cells, and their implications in the proliferative, invasive and migratory capacities of trophoblasts. Hum Reprod Update 13(2): 121-141.
- Fisher SJ (2004).** The placental problem: linking abnormal cytotrophoblast differentiation to the maternal symptoms of preeclampsia. Reprod Biol Endocrinol 2: 53.
- Frede S, Freitag P, Otto T, Heilmaier C, Fandrey J (2005).** The proinflammatory cytokine interleukin 1 β and hypoxia cooperatively induce the expression of adrenomedullin in ovarian carcinoma cells through hypoxia inducible factor 1 activation. Cancer Res 65(11): 4690-4697.
- Fu CT, Bechberger JF, Ozog MA, Perbal B, Naus CC (2004).** CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. J Biol Chem 279(35): 36943-36950.
- Galabova-Kovacs G, Matzen D, Piazzolla D, Meissl K, Plyushch T, Chen AP, Silva A, Baccarini M (2006).** Essential role of B-Raf in ERK activation during extraembryonic development. Proc Natl Acad Sci U S A 103(5): 1325-1330.
- Gellhaus A, Dong X, Propson S, Maass K, Klein-Hitpass L, Kibschull M, Traub O, Willecke K, Perbal B, Lye SJ, Winterhager E (2004).** Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells. J Biol Chem 279(35): 36931-36942.
- Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, Lye SJ, Kimmig R, Winterhager E (2006).** Decreased expression of the angiogenic regulators CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) in human placenta is associated with pre-eclampsia. Mol Hum Reprod 12(6): 389-399.
- Gellhaus A, Schmidt M, Dunk C, Lye SJ, Winterhager E (2007).** The circulating proangiogenic factors CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) are significantly decreased in placentae and sera of preeclamptic patients. Reprod Sci 14(8 Suppl): 46-52.
- Giguere Y, Charland M, Bujold E, Bernard N, Grenier S, Rousseau F, Lafond J, Legare F, Forest JC (2010).** Combining biochemical and ultrasonographic markers in predicting preeclampsia: a systematic review. Clin Chem 56(3): 361-375.
- Gleeson LM, Chakraborty C, McKinnon T, Lala PK (2001).** Insulin-like growth factor-binding protein 1 stimulates human trophoblast migration by signaling through $\alpha 5 \beta 1$ integrin via mitogen-activated protein Kinase pathway. J Clin Endocrinol Metab 86(6): 2484-2493.
- Glukhova L, Angevin E, Lavialle C, Cadot B, Terrier-Lacombe MJ, Perbal B, Bernheim A, Goguel AF (2001).** Patterns of specific genomic alterations associated with poor prognosis in high-grade renal cell carcinomas. Cancer Genet Cytogenet 130(2): 105-110.
- Graham CH, Hawley TS, Hawley RG, MacDougall JR, Kerbel RS, Khoo N, Lala PK (1993).** Establishment and characterization of first trimester human trophoblast cells with extended lifespan. Exp Cell Res 206(2): 204-211.
- Gray H (2004)** Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice, 39th edition, C.V. Mosby, ISBN 0-443-07168-3
- Grill S, Rusterholz C, Zanetti-Dallenbach R, Tercanli S, Holzgreve W, Hahn S, Lapaire O (2009).** Potential markers of preeclampsia--a review. Reprod Biol Endocrinol 7: 70.
- Grümmer R (1991)** Entwicklung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung zellbiologischer Mechanismen der Invasion des menschlichen Trophoblasten. Experimentelle

- Untersuchungen unter Verwendung von Chorionkarzinomzellsphäroiden und Endometrium-Organokultur. Dissertation, RTWH Aachen.
- Grümmer R, Donner A, Winterhager E (1999).** Characteristic growth of human choriocarcinoma xenografts in nude mice. Placenta 20(7): 547-553.
- Grümmer R, Hohn HP, Mareel MM, Denker HW (1994).** Adhesion and invasion of three human choriocarcinoma cell lines into human endometrium in a three-dimensional organ culture system. Placenta 15(4): 411-429.
- Gupta N, Wang H, McLeod TL, Naus CC, Kyurkchiev S, Advani S, Yu J, Perbal B, Weichselbaum RR (2001).** Inhibition of glioma cell growth and tumorigenic potential by CCN3 (NOV). Mol Pathol 54(5): 293-299.
- Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ (2004).** Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. Reprod Biol Endocrinol 2: 58.
- Henson MC, Castracane VD (2006).** Leptin in pregnancy: an update. Biol Reprod 74(2): 218-229.
- Howe A, Aplin AE, Alahari SK, Juliano RL (1998).** Integrin signaling and cell growth control. Curr Opin Cell Biol 10(2): 220-231.
- Huang C, Rajfur Z, Borchers C, Schaller MD, Jacobson K (2003).** JNK phosphorylates paxillin and regulates cell migration. Nature 424(6945): 219-223.
- Huang CY, Lee CY, Chen MY, Tsai HC, Hsu HC, Tang CH (2011).** Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) enhances cell motility and COX-2 upregulation of human osteosarcoma involves $\alpha 5 \beta 1$ integrin, ILK and AP-1-dependent pathways. Biochem Pharmacol 81(5): 577-585.
- Huppertz B, Bartz C, Kokozidou M (2006).** trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs and other prerequisites for syncytial fusion. Micron 37(6): 509-517
- Hustin J, Schaaps JP (1987).** Echographic [corrected] and anatomic studies of the maternotrophoblastic border during the first trimester of pregnancy. Am J Obstet Gynecol 157(1): 162-168.
- Hynes RO (1987).** Integrins: a family of cell surface receptors. Cell 48(4): 549-554.
- Hynes RO (1992).** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69(1): 11-25.
- Hynes RO (2002).** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110(6): 673-687.
- Irving JA, Lala PK (1995).** Functional role of cell surface integrins on human trophoblast cell migration: regulation by TGF- β , IGF-II, and IGFBP-1. Exp Cell Res 217(2): 419-427.
- Jaffe R, Jauniaux E, Hustin J (1997).** Maternal circulation in the first-trimester human placenta--myth or reality? Am J Obstet Gynecol 176(3): 695-705.
- Jauniaux E, Watson AL, Hempstock J, Bao YP, Skepper JN, Burton GJ (2000).** Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. Am J Pathol 157(6): 2111-2122.
- Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK (2001).** Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. Cell Growth Differ 12(7): 363-369.
- Johnstone ED, Mackova M, Das S, Payne SG, Lowen B, Sibley CP, Chan G, Guilbert LJ (2005).** Multiple anti-apoptotic pathways stimulated by EGF in cytotrophoblasts. Placenta 26(7): 548-555.
- Joliot V, Martinerie C, Dambrine G, Plassiart G, Brisac M, Crochet J, Perbal B (1992).** Proviral rearrangements and overexpression of a new cellular gene (nov) in myeloblastosis-associated virus type 1-induced nephroblastomas. Mol Cell Biol 12(1): 10-21.
- Jones MC, Caswell PT, Norman JC (2006).** Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. Curr Opin Cell Biol 18(5): 549-557.

- Katsube K, Chuai ML, Liu YC, Kabasawa Y, Takagi M, Perbal B, Sakamoto K (2001).** The expression of chicken NOV, a member of the CCN gene family, in early stage development. Brain Res Gene Expr Patterns 1(1): 61-65.
- Katsube K, Sakamoto K, Tamamura Y, Yamaguchi A (2009).** Role of CCN, a vertebrate specific gene family, in development. Dev Growth Differ 51(1): 55-67.
- Kaufmann P, Burton GJ (1994)** Anatomy and genesis of the placenta. In Knobil E and Neill JD (eds), *The Physiology of Reproduction*, 2nd edn. Raven Press, New York, USA, 441–484
- King WG, Mattaliano MD, Chan TO, Tschlis PN, Brugge JS (1997).** Phosphatidylinositol 3-kinase is required for integrin-stimulated AKT and Raf-1/mitogen-activated protein kinase pathway activation. Mol Cell Biol 17(8): 4406-4418.
- Klaffky EJ, Gonzales IM, Sutherland AE (2006).** Trophoblast cells exhibit differential responses to laminin isoforms. Dev Biol 292(2): 277-289.
- Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresh DA (1997).** Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. J Cell Biol 137(2): 481-492.
- Kliman HJ (2000).** Uteroplacental blood flow. The story of decidualization, menstruation, and trophoblast invasion. Am J Pathol 157(6): 1759-1768.
- Knöfler M (2010).** Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. Int J Dev Biol 54(2-3): 269-280.
- Kocialkowski S, Yeger H, Kingdom J, Perbal B, Schofield PN (2001).** Expression of the human NOV gene in first trimester fetal tissues. Anat Embryol (Berl) 203(6): 417-427.
- Kohler PO, Bridson WE (1971).** Isolation of hormone-producing clonal lines of human choriocarcinoma. J Clin Endocrinol Metab 32(5): 683-687.
- Kupfermanc MJ, Peaceman AM, Wigton TR, Rehnberg KA, Socol ML (1995).** Fetal fibronectin levels are elevated in maternal plasma and amniotic fluid of patients with severe preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 172(2 Pt 1): 649-653.
- Kyriakis JM, Avruch J (2001).** Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 81(2): 807-869.
- Laigaard J, Sorensen T, Placing S, Holck P, Frohlich C, Wojdemann KR, Sundberg K, Shalmi AC, Tabor A, Norgaard-Pedersen B, Ottesen B, Christiansen M, Wewer UM (2005).** Reduction of the disintegrin and metalloprotease ADAM12 in preeclampsia. Obstet Gynecol 106(1): 144-149.
- Lala PK, Chakraborty C (2003).** Factors regulating trophoblast migration and invasiveness: possible derangements contributing to pre-eclampsia and fetal injury. Placenta 24(6): 575-587.
- Lala PK, Graham CH (1990).** Mechanisms of trophoblast invasiveness and their control: the role of proteases and protease inhibitors. Cancer Metastasis Rev 9(4): 369-379.
- Lala PK, Hamilton GS (1996).** Growth factors, proteases and protease inhibitors in the maternal-fetal dialogue. Placenta 17(8): 545-555.
- Lala PK, Lee BP, Xu G, Chakraborty C (2002).** Human placental trophoblast as an in vitro model for tumor progression. Can J Physiol Pharmacol 80(2): 142-149.
- Lam C, Lim KH, Karumanchi SA (2005).** Circulating angiogenic factors in the pathogenesis and prediction of preeclampsia. Hypertension 46(5): 1077-1085.
- Lash GE, Hornbuckle J, Brunt A, Kirkley M, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN (2007).** Effect of low oxygen concentrations on trophoblast-like cell line invasion. Placenta 28(5-6): 390-398.
- Lazar N, Manara C, Navarro S, Bleau AM, Llombart-Bosch A, Scotlandi K, Planque N, Perbal B (2007).** Domain-specific CCN3 antibodies as unique tools for structural and functional studies. J Cell Commun Signal 1(2): 91-102.
- Le Dreau G, Nicot A, Benard M, Thibout H, Vaudry D, Martinerie C, Laurent M (2010).** NOV/CCN3 promotes maturation of cerebellar granule neuron precursors. Mol Cell Neurosci 43(1): 60-71.
- Leiser R, Kaufmann P (1994).** Placental structure: in a comparative aspect. Exp Clin Endocrinol 102(3): 122-134.

- Lim KH, Zhou Y, Janatpour M, McMaster M, Bass K, Chun SH, Fisher SJ (1997).** Human cytotrophoblast differentiation/invasion is abnormal in pre-eclampsia. Am J Pathol 151(6): 1809-1818.
- Lin CG, Chen CC, Leu SJ, Grzeszkiewicz TM, Lau LF (2005).** Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV (CCN3): implication in wound healing. J Biol Chem 280(9): 8229-8237.
- Lin CG, Leu SJ, Chen N, Tebeau CM, Lin SX, Yeung CY, Lau LF (2003).** CCN3 (NOV) is a novel angiogenic regulator of the CCN protein family. J Biol Chem 278(26): 24200-24208.
- Liu C, Liu XJ, Crowe PD, Kelner GS, Fan J, Barry G, Manu F, Ling N, De Souza EB, Maki RA (1999).** Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) codes for a growth factor that induces protein tyrosine phosphorylation. Gene 238(2): 471-478.
- Loregger T, Pollheimer J, Knofler M (2003).** Regulatory transcription factors controlling function and differentiation of human trophoblast--a review. Placenta 24 Suppl A: S104-110.
- Lunghi L, Ferretti ME, Medici S, Biondi C, Vesce F (2007).** Control of human trophoblast function. Reprod Biol Endocrinol 5: 6.
- Ma XJ, Fu YY, Li YX, Chen LM, Chai K, Wang YL (2009).** Prostatin inhibits cell invasion in human choriocarcinoma JEG-3 cells. Histochem Cell Biol 132(6): 639-646.
- Maillard M, Cadot B, Ball RY, Sethia K, Edwards DR, Perbal B, Tatoud R (2001).** Differential expression of the ccn3 (nov) proto-oncogene in human prostate cell lines and tissues. Mol Pathol 54(4): 275-280.
- Maley F, Trimble RB, Tarentino AL, Plummer TH, Jr. (1989).** Characterization of glycoproteins and their associated oligosaccharides through the use of endoglycosidases. Anal Biochem 180(2): 195-204.
- Manning BD, Cantley LC (2007).** AKT/PKB signaling: navigating downstream. Cell 129(7): 1261-1274.
- Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield PN, Le Bouc Y (2001).** Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. J Clin Endocrinol Metab 86(8): 3929-3940.
- Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P (2004).** Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. Placenta 25(2-3): 127-139.
- Maynard MA, Ohh M (2007).** The role of hypoxia-inducible factors in cancer. Cell Mol Life Sci 64(16): 2170-2180.
- McCallum L, Irvine AE (2009).** CCN3--a key regulator of the hematopoietic compartment. Blood Rev 23(2): 79-85.
- McCallum L, Lu W, Price S, Lazar N, Perbal B, Irvine AE (2011).** CCN3 suppresses mitogenic signalling and reinstates growth control mechanisms in Chronic Myeloid Leukaemia. J Cell Commun Signal.
- McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson LM, Chidiac P, Lala PK (2001).** Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK. J Clin Endocrinol Metab 86(8): 3665-3674.
- Minamizato T, Sakamoto K, Liu T, Kokubo H, Katsube K, Perbal B, Nakamura S, Yamaguchi A (2007).** CCN3/NOV inhibits BMP-2-induced osteoblast differentiation by interacting with BMP and Notch signaling pathways. Biochem Biophys Res Commun 354(2): 567-573.
- Miyoshi E, Ito Y, Miyoshi Y (2010).** Involvement of aberrant glycosylation in thyroid cancer. J Oncol 2010: 816595.
- Moser G, Gauster M, Orendi K, Glasner A, Theuerkauf R, Huppertz B (2010).** Endoglandular trophoblast, an alternative route of trophoblast invasion? Analysis with novel confrontation co-culture models. Hum Reprod 25(5): 1127-1136.
- Mühlhauser J, Crescimanno C, Kaufmann P, Hofler H, Zaccheo D, Castellucci M (1993).** Differentiation and proliferation patterns in human trophoblast revealed by c-erbB-2 oncogene product and EGF-R. J Histochem Cytochem 41(2): 165-173.

- Myatt L (2002).** Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine* 19(1): 103-111.
- O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF (1990).** Expression of *cyr61*, a growth factor-inducible immediate-early gene. *Mol Cell Biol* 10(7): 3569-3577.
- Ohlsson R (1989).** Growth factors, protooncogenes and human placental development. *Cell Differ Dev* 28(1): 1-15.
- Patel J, Landers K, Mortimer RH, Richard K (2010).** Regulation of hypoxia inducible factors (HIF) in hypoxia and normoxia during placental development. *Placenta* 31(11): 951-957.
- Pattillo RA, Gey GO, Delfs E, Mattingly RF (1968).** Human hormone production in vitro. *Science* 159(3822): 1467-1469.
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001).** Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 22(2): 153-183.
- Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Watanabe C, Cohen RL, Melhem MF, Finley GG, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Gurney AL, Botstein D, Levine AJ (1998).** WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(25): 14717-14722.
- Peracaula R, Barrabes S, Sarrats A, Rudd PM, de Llorens R (2008).** Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. *Dis Markers* 25(4-5): 207-218.
- Perbal B (2001).** NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. *Mol Pathol* 54(2): 57-79.
- Perbal B (2003).** The CCN3 (NOV) cell growth regulator: a new tool for molecular medicine. *Expert Rev Mol Diagn* 3(5): 597-604.
- Pijnenborg R, Dixon G, Robertson WB, Brosens I (1980).** Trophoblastic invasion of human decidua from 8 to 18 weeks of pregnancy. *Placenta* 1(1): 3-19.
- Planque N, Perbal B (2003).** A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis. *Cancer Cell Int* 3(1): 15.
- Poon LC, Chelemen T, Granvillano O, Pandeva I, Nicolaides KH (2008).** First-trimester maternal serum a disintegrin and metalloprotease 12 (ADAM12) and adverse pregnancy outcome. *Obstet Gynecol* 112(5): 1082-1090.
- Prast J, Saleh L, Husslein H, Sonderegger S, Helmer H, Knofler M (2008).** Human chorionic gonadotropin stimulates trophoblast invasion through extracellularly regulated kinase and AKT signaling. *Endocrinology* 149(3): 979-987.
- Pringle KG, Kind KL, Sferruzzi-Perri AN, Thompson JG, Roberts CT (2010).** Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Hum Reprod Update* 16(4): 415-431.
- Qiang YW, Yao L, Tosato G, Rudikoff S (2004).** Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood* 103(1): 301-308.
- Qiu Q, Basak A, Mbikay M, Tsang BK, Gruslin A (2005).** Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31): 11047-11052.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A (2004a).** Both mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling are required in epidermal growth factor-induced human trophoblast migration. *Mol Hum Reprod* 10(9): 677-684.
- Qiu Q, Yang M, Tsang BK, Gruslin A (2004b).** EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction* 128(3): 355-363.
- Redman CW, Sargent IL (2005).** Latest advances in understanding preeclampsia. *Science* 308(5728): 1592-1594.
- Ren B, Deng Y, Mukhopadhyay A, Lanahan AA, Zhuang ZW, Moodie KL, Mulligan-Kehoe MJ, Byzova TV, Peterson RT, Simons M (2010).** ERK1/2-Akt1 crosstalk regulates arteriogenesis in mice and zebrafish. *J Clin Invest* 120(4): 1217-1228.
- Ren K, Jin H, Bian C, He H, Liu X, Zhang S, Wang Y, Shao RG (2008).** MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through myosin light

- chains-2 (MLC2)/focal adhesion kinase (FAK)/Akt signaling pathway. J Biol Chem 283(51): 35598-35605.
- Restuccia DF, Hemmings BA (2010).** From man to mouse and back again: advances in defining tumor AKTivities in vivo. Dis Model Mech 3(11-12): 705-720.
- Rouslathi E und Pierschbacher MD (1987).** New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science 238(4826):491-497
- Sachdev P, Zeng L, Wang LH (2002).** Distinct role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rho family GTPases in Vav3-induced cell transformation, cell motility, and morphological changes. J Biol Chem 277(20): 17638-17648.
- Sakamoto K, Yamaguchi S, Ando R, Miyawaki A, Kabasawa Y, Takagi M, Li CL, Perbal B, Katsube K (2002).** The nephroblastoma overexpressed gene (NOV/ccn3) protein associates with Notch1 extracellular domain and inhibits myoblast differentiation via Notch signaling pathway. J Biol Chem 277(33): 29399-29405.
- Salдова R, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM (2008).** Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. Dis Markers 25(4-5): 219-232.
- Sastry SK, Horwitz AF (1993).** Integrin cytoplasmic domains: mediators of cytoskeletal linkages and extra- and intracellular initiated transmembrane signaling. Curr Opin Cell Biol 5(5): 819-831.
- Schatz F, Lockwood CJ (1993).** Progesterin regulation of plasminogen activator inhibitor type 1 in primary cultures of endometrial stromal and decidual cells. J Clin Endocrinol Metab 77(3): 621-625.
- Schuppan D, Ocker M (2003).** Integrin-mediated control of cell growth. Hepatology 38(2): 289-291.
- Seger R, Krebs EG (1995).** The MAPK signaling cascade. FASEB J 9(9): 726-735.
- Shaw LM, Rabinovitz I, Wang HH, Toker A, Mercurio AM (1997).** Activation of phosphoinositide 3-OH kinase by the alpha6beta4 integrin promotes carcinoma invasion. Cell 91(7): 949-960.
- Shields SK, Nicola C, Chakraborty C (2007).** Rho guanosine 5'-triphosphatases differentially regulate insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor-dependent and -independent actions of IGF-II on human trophoblast migration. Endocrinology 148(10): 4906-4917.
- Shih le M, Kurman RJ (2002).** Molecular basis of gestational trophoblastic diseases. Curr Mol Med 2(1): 1-12.
- Shimoyama T, Hiraoka S, Takemoto M, Koshizaka M, Tokuyama H, Tokuyama T, Watanabe A, Fujimoto M, Kawamura H, Sato S, Tsurutani Y, Saito Y, Perbal B, Koseki H, Yokote K (2010).** CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol 30(4): 675-682.
- Sibai BM (2003).** Diagnosis and management of gestational hypertension and preeclampsia. Obstet Gynecol 102(1): 181-192.
- Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD (2000).** FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. Nat Cell Biol 2(5): 249-256.
- Sin WC, Bechberger JF, Rushlow WJ, Naus CC (2008).** Dose-dependent differential upregulation of CCN1/Cyr61 and CCN3/NOV by the gap junction protein Connexin43 in glioma cells. J Cell Biochem 103(6): 1772-1782.
- Sin WC, Tse M, Planque N, Perbal B, Lampe PD, Naus CC (2009).** Matricellular protein CCN3 (NOV) regulates actin cytoskeleton reorganization. J Biol Chem 284(43): 29935-29944.
- Strickland S, Richards WG (1992).** Invasion of the trophoblasts. Cell 71(3): 355-357.
- Su BY, Cai WQ, Zhang CG, Su HC, Perbal B (1998).** A developmental study of novH gene expression in human central nervous system. C R Acad Sci III 321(11): 883-892.
- Tureckova J, Vojtechova M, Krausova M, Sloncova E, Korinek V (2009).** Focal adhesion kinase functions as an akt downstream target in migration of colorectal cancer cells. Transl Oncol 2(4): 281-290.

- Tzeng HE, Chen JC, Tsai CH, Kuo CC, Hsu HC, Hwang WL, Fong YC, Tang CH (2011).** CCN3 increases cell motility and MMP-13 expression in human chondrosarcoma through integrin dependent pathway. J Cell Physiol.
- Varanou A, Withington SL, Lakasing L, Williamson C, Burton GJ, Hemberger M (2006).** The importance of cysteine cathepsin proteases for placental development. J Mol Med (Berl) 84(4): 305-317.
- Weinstein L (1982).** Syndrome of hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelet count: a severe consequence of hypertension in pregnancy. Am J Obstet Gynecol 142(2): 159-167.
- White DP, Caswell PT, Norman JC (2007).** alpha v beta3 and alpha5beta1 integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. J Cell Biol 177(3): 515-525.
- Williams MJ, Hughes PE, O'Toole TE, Ginsberg MH (1994).** The inner world of cell adhesion: integrin cytoplasmic domains. Trends Cell Biol 4(4): 109-112.
- WHO (2005)** World Health Report: Make Every Mother and Child Count. Geneva: World Health Org
- Wolf N, Yang W, Dunk CE, Gashaw I, Lye SJ, Ring T, Schmidt M, Winterhager E, Gellhaus A (2010).** Regulation of the matricellular proteins CYR61 (CCN1) and NOV (CCN3) by hypoxia-inducible factor-1{alpha} and transforming-growth factor-{beta}3 in the human trophoblast. Endocrinology 151(6): 2835-2845.
- Yang W, Wagener J, Wolf N, Schmidt M, Kimmig R, Winterhager E, Gellhaus A (2011).** Impact of CCN3 (NOV) glycosylation on migration/invasion properties and cell growth of the choriocarcinoma cell line Jeg3. Hum Reprod.
- Yang ZZ, Tschopp O, Hemmings-Mieszczak M, Feng J, Brodbeck D, Perentes E, Hemmings BA (2003).** Protein kinase B alpha/Akt1 regulates placental development and fetal growth. J Biol Chem 278(34): 32124-32131.
- Yinon Y, Nevo O, Xu J, Many A, Rolfo A, Todros T, Post M, Caniggia I (2008).** Severe intrauterine growth restriction pregnancies have increased placental endoglin levels: hypoxic regulation via transforming growth factor-beta 3. Am J Pathol 172(1): 77-85.
- Zhang HJ, Siu MK, Yeung MC, Jiang LL, Mak VC, Ngan HY, Wong OG, Zhang HQ, Cheung AN (2011).** Overexpressed PAK4 promotes proliferation, migration and invasion of choriocarcinoma. Carcinogenesis 32(5): 765-771.
- Zhou J, Schmid T, Brune B (2003).** Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. Mol Biol Cell 14(6): 2216-2225.
- Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ (1993).** Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. J Clin Invest 91(3): 950-960.
- Zhou Y, Fisher SJ, Janatpour M, Genbacev O, Dejana E, Wheelock M, Damsky CH (1997).** Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? J Clin Invest 99(9): 2139-2151.
- Zhou Y, McMaster M, Woo K, Janatpour M, Perry J, Karpanen T, Alitalo K, Damsky C, Fisher SJ (2002).** Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. Am J Pathol 160(4): 1405-1423.
- Zygmunt M, Hahn D, Munstedt K, Bischof P, Lang U (1998).** Invasion of cytotrophoblastic JEG-3 cells is stimulated by hCG in vitro. Placenta 19(8): 587-593.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „NOV (CCN3)-vermittelte Signalkaskaden zur Regulation der Migration und Proliferation der humanen Trophoblastzelllinie Jeg3“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Jessica Wagener befürworte.

Essen, den 16.08.2011

Prof. Dr. rer. nat. Elke Winterhager

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 16.08.2011

Jessica Wagener

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 16.08.2011

Jessica Wagener

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. Winterhager danke ich für die fachliche und freundliche Unterstützung, die interessante Themenstellung und die ständige Diskussionsbereitschaft. Außerdem bedanke ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme an verschiedenen Kongressen, bei denen ich meine Arbeit präsentieren konnte.

Bei Frau Dr. Alexandra Gellhaus bedanke ich mich für die kompetente Betreuung, die Hilfestellung bei Fragen und Problemen und die aufmunternden Worte während meiner gesamten Promotionszeit.

Allen Kooperationspartnern des ELISA-Projektes danke ich für die tolle Zusammenarbeit und die nette Atmosphäre bei diversen Meetings. Hier gilt mein besonderer Dank Jens Rasch für die Durchführung und Hilfestellung bei den NOV- und ADAM12-ELISAs und die Akquirierung der Patientenproben.

Siegfried Moyrer danke ich für die Hilfestellung bei sämtlichen Computerproblemen.

Ein großer Dank geht an die gesamte Arbeitsgruppe Winterhager und an alle ehemaligen Mitglieder für eine schöne und unvergessliche Zeit innerhalb und außerhalb des Labors! Es hat Spaß gemacht mit Euch zu arbeiten und mit Euch zu feiern!

Mein besonderer Dank geht an meine Familie und an meine Freunde. Dafür, dass Ihr mich unterstützt habt und in jeder Lebenslage für mich da wart!